فيروسات النبات

د . عصمت خالد علام

د . السيد أحمد سلامة   د . رشدى عبد الباقى عمر



المكتبة الأكاديمية

فيروسات النبات

فيروسات النبات

د. عصمت خالد علام

استاذ الفيرولوجى بكلية الزراعة - جامعة عين شمس (متفرغ)
وكيل كلية الزراعة - جامعة عين شمس للدراسات العليا والبحوث
ورئيس قسم الميكروبيولوجيا الزراعية (سابقاً)
عضو اللجنة الدولية لتقسيم الفيروسات
حائز على وسام الجمهورية
عضو اللجان القومية المتخصصة (التعليم الجامعى)

د. السيد أحمد سلامه

أستاذ أمراض النبات الفيروسية
بكلية الزراعة جامعة القاهرة (متفرغ)
أستاذ الأمراض الفيروسية السابق بجامعة
بغداد بالعراق وجامعة الملك فيصل
بالمملكة العربية السعودية

د. رشدى عبد الباقى عمر

أستاذ أمراض النبات الفيروسية
بكلية الزراعة جامعة طنطا (متفرغ) بكفر الشيخ
رئيس قسم النبات الزراعى سابقاً
وكيل كلية الزراعة للدراسات العليا والبحوث سابقاً
وعميد كلية الزراعة الأسبق



الناشر

المكتبة الأكاديمية

٢٠٠٠

حقوق النشر

المكتبة الأكاديمية

١٢١ شارع التحرير - الدقى - القاهرة

تليفون : ٣٤٨٥٢٨٢ / ٣٤٩١٨٩٠

فاكس : ٣٤٩١٨٩٠ - ٢٠٢

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا أنك أنت العليم الحكيم ﴾

تقديـــم

يواجه العالم عامة والأقطار النامية فيه خاصة مشكلة من أعقد المشاكل وأخطرها. تلك هى مشكلة الجوع ونقص المواد الغذائية التى تهدد ملايين البشر بالفناء.

إن العالم - طبقًا لتقدير الهيئات الدولية - يحتاج بالضرورة إلى مضاعفة إنتاجه من المحاصيل الزراعية مع بداية القرن الحادى والعشرين.

أن الدول المتقدمة تستطيع بإمكاناتها ومواردها وتوافر الخبرة والمال لديها وانتشار الوعى بين شعوبها أن تواجه المشكلة وأن تتغلب عليها، غير أن حل هذه المشكلة يبدو من الأمور التى تحتاج إلى دراسة واعية مستنيرة وتخطيط سديد محكم من جانب الدول النامية التى تنقصها الخبره وتفتقر إلى المال ويقل فيها الوعى.

على الرغم من أن الموضوع الذى يتناوله هذا الكتاب بالدراسة له أهميته وحيويته وخطورته باعتبار أن الإنتاج الزراعى والنباتات المختلفة وما يؤثر عليها من أمراض وآفات وخاصة الفيروسات النباتية ذو أهمية كبرى، ومن العوامل التى قد تحد من الإنتاج الزراعى فى حالة وبائية بعض الفيروسات.

والمكتبة العربية ستظل فى حاجة إلى مراجع علمية، تعالج مشكلات الفيروسات النباتية فى تلك البلاد ووسائل الحد من الفقد فيها لسد حاجة شعوبها من الغذاء.

ولقد كان الشعور السائد بالحاجة الملحة إلى مثل هذه المراجع هو الدافع الأساسى للمؤلفين لإصدار هذا الكتاب. ولما للمؤلفين من رصيد فى هذا المضمار، فقد قاموا بالتدريس والقاء المحاضرات والبحوث فى الجامعات العربية فى مصر والعراق والمملكة العربية السعودية لعدة سنين بالإضافة إلى التجديد وطرق المستحدث من موضوعات، وكانت ثمره جهدهم أن أخرج هذا الكتاب بالصورة التى يراها القارىء الآن.

وقد قسم الكتاب إلى عدة فصول، تناول كل منها جانباً من الموضوع، وقد زود الكتاب بعدد كبير من الأشكال والجداول والرسوم وذيل بقائمة لبعض المصطلحات المهمة، بالإضافة إلى قائمة ببعض المراجع العربية والأجنبية التى ينصح بالرجوع إليها للاستزادة.

ونحن نرجو أن نكون قد وفقنا فى إخراج هذا المؤلف ليسد نقصاً فى المكتبة العلمية العربية . ونأسف لأى خطأ أو قصور قد يلحظه القارىء، ونرحب فى الوقت نفسه بأى توصية وبكل نقد بناء .

ويأمل المؤلفين أن يكونوا قد وفقوا إلى غايتهم؛ حتى يكون لهذا الكتاب فائدته المنشودة للدارسين والمهتمين بعلم فيروسات النبات .

ويشكر المؤلفون كل من ساهم أو ساعد فى إنجاز هذا المرجع، ويخصون بالشكر المسئولين بالمكتبة الأكاديمية بالدقى .

والله نسأل أن يوفقنا إلى الخير والسداد ويهيئ لنا من أمرنا رشدا .

المؤلفون

أ . د . عصمت خالد علام

أ . د .السيد أحمد سلامه

أ . د .رشدى عبد الباقى عمر

القاهرة / / ٢٠٠٠

محتويات الكتاب

الباب الأول

مقدمـــة

INTRODUCTION

مقدمـة

INTRODUCTION

نبذة تاريخية :

وجدت الفيروسات كمسببات للأمراض الفيروسية على النباتات منذ زمن طويل، فلوحظت ظاهرة تبقع الوان الأزهار وانكسار الألوان Colour Break من نحو أربعمائة سنة مضت، حيث كانت تسترعى النظر لجمال الأزهار التى تحدث فيها. وجاء وصف انكسار اللون فى زهرة التوليب عام ١٥٧٥ فى كتاب وضعه كارولس Carolus clusius منذ ٣٠٠ سنة، كما رسمها غيره من الفنانين الهولنديين، وفى عام ١٧٦٥ اشتد مرض التفاف وتجعد أوراق البطاطس بشكل وبائى، أثر على محصوله تاثيراً سيئًا، ولم يعرف عن طبيعته المرضية شيء، وساد الاعتقاد يومئذ أنه نتيجة لتدهور تدريجى فى نبات البطاطس لتكرار زراعته عامًا بعد آخر فى بلد واحد.

ولم يكن سبب الأمراض الوبائية فى الإنسان والحيوان معروفًا، بل كانت الأمراض تعزى إلى الأرواح الشريرة أو إلى غضب الله وانتقامه، أو أنها تتساقط من السماء مع الأمطار والضباب الكثيف أو تذروها الرياح وتنشرها من مكان إلى آخر، وغير ذلك من معتقدات خاطئة وخرافات غريبة.

وكان اكتشاف الطفيليات كعامل يسبب الأمراض الوبائية أول معول هدم به العلم الحديث بعض هذه المعتقدات؛ إذ أفاد عمل باستير (L. Pasteur 1822-1895) وكوخ وعلماء آخرين فى تسليط كثير من الأضواء فى منتصف القرن التاسع عشر على مسببات الأمراض المعدية؛ حيث اكتشفت واحد تلو الآخر من مسببات الأمراض المعدية المختلفة، وأصبح من السهل أن يكون لأى عدوى مسبب خاص من عالم الميكروبات.

وكان من غير الممكن فصل مسببات بعض الأمراض، والتى تسبب خسارة واضحة فى عالم الإنسان والحيوان والنبات إلى أن قدمت أعمال العالم الروسى ديميترى أيفانوفسكى

١٨٦٤-١٩٢٠ Dimitri Iwanowski حلا لذلك وهو اكتشاف الفيروس.

وقبل عمل أيفانوفسكى تجمعت بعض المعلومات من حالات مرضية فى الإنسان والحيوان والنبات، ولكن لم يوضح ولم يميز مسببات هذه الحالات تمييزاً كاملاً. ففى هولندا عام ١٨٨٦ درس ماير A.Mayer مرضاً ظهر على أوراق الدخان على هيئة تبقع الأوراق باللون الأخضر القاتم مختلطاً باللون الأخضر المصفر، اطلق عليه اسم موزايك Mosaic، وأثبت وجود مسبب المرض والعدوى فى عصير أوراق النباتات المصابة، إلا أنه لم ينجح فى فصل المسبب. وفى عام ١٨٨٨م اكتشف سميث Smith أن مرض اصفرار الخوخ، هو كذلك مرض معدٍ يمكن نقله من نبات مصاب إلى آخر سليم بالحقن أو التطعيم. وفى عام ١٨٩٨م قام عالم النبات بيجرنك W.Beijerinck بإجراء تجارب على مرض موزيك الدخان وأثبت أن المسبب يمر من خلال المرشحات التى تحجز أدق المكونات التى جعلته يقول إن المسبب عبارة عن «محلول حيوى معدى Contagium vivum fluidum، اى إن المسبب صغير الحجم جداً، وأطلق على المسبب اسم فيروس Virus أى «سم»، وأطلق على الأمراض الوبائية التى لم تكتشف لها مسببات ممرضة اسم «أمراض فيروسية»، وفى عام ١٨٩٢ بدأ أيفانوفسكى عمله على مرض موزيك الدخان، الذى كان منتشراً فى مزارع الدخان ببلاد كريم بالاتحاد السوفيتى، والذى سبب خسائر فادحة لزراعة الدخان والطماطم فى هذه الفترة.

وأتم عمله عام ١٩٠٢م ونشرت رسالته للدكتوراه عن مرض موزيك الدخان. أثبت فى هذا البحث أن عصير اوراق نباتات الدخان المصابة يحتوى على مسبب معدٍ صغير الحجم جداً، لدرجة أنه يمر خلال مرشحات البكتريا وأطلق عليه Filtrable agent. ومن هذا التاريخ توالت الاكتشافات لمسببات أمراض فيروسية كثيرة سواء فى النبات أو الحيوان.

وفى عام ١٩٠٩ اكتشف العالم الأمريكى T.R. Riketts مسبباً لبعض الأمراض المعدية للإنسان والحيوان، وقد وجد أن هذا المسبب يحتل مكانا بين البكتريا والفيروس، ولو أنه لايوجد سبب يدل على أنه يمثل حلقة تطور بين المجموعتين، وأطلق عليه اسمه ريكتسيا. وفى عام ١٩١٥ اكتشف العالم الإنجليزى تورت Twort والعالم الفرنسى ديهريل D'herelle ١٩١٧م فيروس يصيب البكتريا وسمى بكتربوفاج (آكل البكتريا) Bacteriophage.

وكانت ولاتزال كلمة أمراض فيروسية تطلق على كل الأمراض، التى لم تكن مسبباتها معروفة ولكن بالتقدم العلمى والتكنولوجى أمكن تشخيص مسببات بعض الأمراض، والتى وجد أنها ليست فيروسات، فقد ظهر أن مسبب بعض من هذه الأمراض عبارة عن ريكتسيا، ومنها أمراض اصفرار الجزر وتورد بنجر السكر وخلافه، ويصل عدد الأمراض التى تسببها الريكتسيا إلى عشرين مرضا. كما عرفت الميكوبلازما كمسببات لبعض أمراض الإنسان والحيوان منذ زمن بعيد (منذ نهاية القرن التاسع عشر) إلا أن أهميتها كمسببات لأمراض نباتية لم تعرف إلا فى عام ١٩٦٧ ببدء عمل داو وآخرين Doi et al عندما تمكنوا من معرفة أن مرض اصفرار الأستر Aster yellows يتسبب عن ميكروب يشبه الميكوبلازما، وليس عن فيروس كما كان يعتقد من قبل. ومنذ ذلك الوقت أمكن حتى الآن التعرف على بعض الأمراض الأخرى، التى تسببها ميكروبات تشبه الميكوبلازما حتى وصل عددها إلى أكثر من مائتى مرض. وفى عام ١٩٦٧ اكتشف T.Diener مسبباً آخر لبعض الأمراض أصغر حجماً من الفيروس، أطلق عليه عام ١٩٧١ اسم فيرويد Viroid، وهو عبارة عن حمض نواة عارٍ RNA فقط ذو وزن جزيئى منخفض، ومن الأمراض التى يسببها مرض الدرنه المغزلية فى البطاطس Spindle tuber disease ومرض اكسوكورتس الموالح، تشقق القلف Citrus excortis وغيرها، حيث بلغ عددها للآن ثلاث عشر مرضاً، ولا تزال مجهودات العلماء مستمرة فى التعرف على مسببات أخرى مرضية. وبذلك أصبحت مسببات الأمراض النباتية ليس فقط الفطر والطحالب والبكتريا، ولكن أضيف لها الريكتسيا والميكوبلازما والفيروس والفيرويد.

وتختلف هذه المسببات المرضية عن بعضها فى كثير من الخواص، فتختلف فى شكلها وحجمها وطريقة إصابتها ومدى تأثيرها على العائل.

الأهمية الاقتصادية:

أخذت الأمراض الفيروسية أهميتها التاريخية لما تسببه من أمراض وبائية فى بعض المحاصيل المهمة فى كثير من بلدان العالم، والتى ينتج عنها خسائر كبيرة فى المحصول مما يؤثر على الاقتصاد الزراعى لتلك البلدان. فمثلاً سببت أمراض البطاطس الفيروسية تدهوراً فى

محصول البطاطس فى أوروبا عام ١٧٧٥؛ مما جعل كثير من الزراع يحجمون عن زراعته. وفى ساحل الذهب سبب مرض تشوه البراعم باشجار الكاكاو موت عدة ملايين شجرة، عام ١٩٣٩ ومن عام ١٩٣٩ حتى عام ١٩٤٥ مات كل سنة حوالى خمسة ملايين شجرة، ومن عام ١٩٤٥-١٩٤٨ مات سنوياً حوالى ١٥ مليون شجرة. وأصاب فيروس التدهور السريع مزارع الموالح فى كثير من مناطق زراعتها، وسبب موت ٧ ملايين شجرة فى ولاية سان باولو بالبرازيل فى مدة اثنى عشر عاماً، وهى تمثل حوالى ٧٥٪ من أشجار الولاية.

وتستورد جمهورية مصر العربية سنوياً تقاوى بطاطس لزراعة العروة الصيفى بما قيمته ملايين الدولارات تزداد سنوياً، حتى وصلت إلى ١٤ مليون دولار عام ١٩٨٦، وذلك بسبب الأمراض الفيروسية، كما يقل محصول العروة النيلى إلى نصف محصول العروة الصيفى تقريباً بسبب انتشار الأمراض الفيروسية بالمزارع هذا، علاوة على ما يسببه الفيروس من أمراض تقلل من محصول الخضروات والطماطم بصفة خاصة ونباتات الفاكهة مثل الموالح والموز، ونباتات الزينة كالقرنفل والأبصال ونباتات المحاصيل الحقلية كالقصب والذرة.

غالباً ما يكون من الصعب الحصول على معلومات دقيقة عن الخسائر المباشرة، التى يتعرض لها المحصول نتيجة للإصابة بالفيروسات وعن القيمة النقدية للعمليات التى يجب أن تجرى لمقاومة الأمراض المتسببة عنها، أو حتى لتقليل النقص إلى أدنى حد ممكن.

كما أن حجم الخسائر المباشرة فى مختلف المحاصيل يختلف من سنة لأخرى، ومن منطقة لأخرى، ولذا لا يمكن أن يعتبر متوسط النقص الناجم عن مرض ما مقياساً حقيقياً فى كل الأحوال. ومن هنا **يمكن اتخاذ الثلاث اتجاهات التالية التى يمكن أن يحدث فيها نقص المحصول نتيجة الإصابة الفيروسية:**

١ - **إصابة المحاصيل المعمرة** (أساساً الأشجار الخشبية) التى تؤدى إلى موت أو إضعاف النباتات مما يتسبب عنه آثار جسيمة؛ حيث إن زراعة هذه النباتات تتطلب وقتاً طويلاً كما أنها تشغل الحقل فترة زمنيه طويلة. ومن أوضح الأمثلة على ذلك أمراض تدهور

الموالح فى أمريكا ومرض تشوه براعم أشجار الكاكاو، الذى يصيب هذا المحصول فى غرب أفريقيا.

٢ - **إصابة المحاصيل الحولية التى تزرع بالبذرة**، ولها أمثلة كثيرة مثل عدد كبير من الأمراض التى تصيب محاصيل الخضر، والتى يتفاوت فيها النقص أو الخسائر المحصولية تفاوتًا كبيرًا من سنة لأخرى، وكذلك الحال بالنسبة لمحاصيل الحقل؛ ففى الولايات المتحدة يبلغ متوسط الخسائر الناجمة فى محصول القمح عن الأمراض الفيروسية حوالى ٢٪ فى حين بلغ هذا النقص سنة ١٩٥٩ فى ولاية كنساس وحدها ٢٠٪.

٣ - **إصابة المحاصيل التى تتكاثر خضريًا** وعلى سبيل المثال محصول البطاطس وكثير من نباتات الزينة. وفى هذا الحال تصاب كثير من النباتات بأمراض فيروسية شديدة.

وفى الوقت نفسه تكون المظاهر (الأمراض) ضعيفة. وغالبًا ما تكون النباتات مصابة إصابة جهازية، ولكن نقص المحصول يكون غير كبير (حوالى ١٠٪).

إن قيمة المعلومات حول نقص المحصول تتوقف على المحصول نفسه. وعلى سبيل المثال يعتبر متوسط النقص الناتج عن المرض فى:

أ - **الأشجار المثمرة** مؤشرًا دقيقًا، إذا ما درس لعدد من السنين، حيث وجد أن وزن التفاح يقل على مدى واسع من السنين (سبع سنوات) بمعدل ثابت فى صنف (لورد لامبوريه).

وفى عدد كبير من أصناف الكريز فإن الإصابة الفيروسية تؤدى إلى نقص فى المحصول، إلا أن هذا النقص لا يظهر عند إصابة صنف الكريز (مرثون – هارت) بفيروس تفصص الأوراق، حيث أن خصوبة النباتات (الإخصاب) زادت بشكل واضح فى هذه الحالة.

ب - **وفى حالة المحاصيل الحولية التى تزرع بالبذرة** يمكن أن يقيم النقص الناتج عن الإصابة الفيروسيه بدقة، إن لم تتدخل عوامل أخرى مثل الإصابة بطفيليات أخرى أو كان يعانى النبات من عدم توازن الغذاء؛ حيث فى هذه الحالة فقط يمكن أن

ينسب النقص الناتج إلى الإصابة الفيروسية.

جـ - كما أن النقص فى **المحاصيل التكنولوجية** مثل قصب السكر لا يمكن أن يقيم بدقة إلا بعد تقدير النقص فى محصول السكر نفسه. كما يمكن تقدير النقص فى المحصول إذا علم بالضبط نسبة الإصابة.

د - وفيما يتعلق **بالمحاصيل التى تتكاثر خضرياً** فإنه فى اغلب الأحوال يتعذر تقدير الخسائر على وجه الدقة، حيث إنه فى أغلب الأحوال يتعذر الحصول على العينات السليمة اللازمة للمقارنة، فعلى مدى سنوات عديدة كان فيروس البطاطس E يعتبر عديم التأثير على محصول البطاطس صنف كنج إدوارد إلا أنه عندما تمكن Kassanis من الحصول على نواة من هذا الصنف خالية من الإصابة الفيروسية زاد محصول هذه النواة بما يعادل ١٠٪ عن محصول أحسن وأجود التقاوى التجارية من هذا الصنف، وكانت الدرنات أكثر انتظاماً من حيث شكلها الخارجى.

وعموماً من المتعذر إيجاد طريقة قياسية لتقدير النقص فى غلة هذا أو ذاك من المحاصيل عند إصابته بهذا أو بذاك من الفيروسات. ولذا فإنه **لتقدير حجم النقص** لابد أن تحدد طبيعة المكان وظروف فترة النمو الخضرى، كما أن هذه التقديرات تتوقف إلى حد كبير على صنف النبات العائل وسلاله الفيروس وعلى عدد وكفاءة الناقلات وعلى وقت أو موعد ظهور الإصابة، وعلى حالة النباتات العامة، وعلى الظروف الجوية السائدة وكذا وجود أو عدم وجود طفيليات اخرى.

فإن إصابة العائل بفيروسين فى وقت واحد يؤدى إلى ضرر من نوع خاص فمثلاً عند إصابة فول الصويا بسلالات مختلفة من فيروس موزيك الصويا، فإن نقص المحصول يتراوح ما بين ٨-٢٥٪، أما إذا أصيبت النباتات فى الوقت نفسه بفيرس تبقع قرون الفاصوليا فإن النقص يرتفع إلى ٨٠٪.

كما أن الإصابة المبكرة للنباتات تؤدى إلى الزيادة فى نقص المحصول.

كما أن تأثير موعد هجرة المن على نقص المحصول يظهر بوضوح فى حالة إصابة زراعات

الجزر بفيرس التقزم المخطط الذى ينتشر عن طريق مَنْ ***Carariella acgogodu***.

فقد وجد أنه عند زيادة **أعداد المن المهاجرة** إلى حقول الجزر عشر مرات فإن المحصول ينقص بمقدار ١٥ طنًا فى الهكتار الواحد. ومما يزيد من تعقيد هذا التقدير تعرض هذه الزراعات للجفاف فى هذه الفترة مما يؤدى لتهيئة الظروف لهجرة المن وتكاثره ومعاكسته لنمو النباتات، حيث قلت نسبة إنبات البذور.

وفى حالة الإصابة المتأخرة فإن معدلات نقص المحصول تقل، إذ وجد برودبينت وآخرون Broadbent et al أن نباتات البطاطس التى تصاب فى أواخر عمرها بفيرس التفاف الأوراق تنتج غالبًا درنات خالية من الفيرس المذكور.

وفى بريطانيا قدر النقص فى محصول بنجر السكر فى سنوات ١٩٤٦–١٩٦٢، ووجد أن متوسط النقص الناتج من فيروسات اصفرار بنجر السكر يقدر حوالى ٦ر٨٪، فى حين أن Hall قدر النقص فى سنة ١٩٥٧ فى محصول بنجر السكر من الفيروسات، فكان أكثر قليلاً من واحد مليون طن.

وعند تقدير النقص أو الخسارة فمن الواجب أو من الضرورى ألا يحسب نقص المحصول فى نبات واحد أو هكتار واحد فحسب، فإذا كان المحصول جمع عدة مرات على مدى الموسم وإذا كان سعر المحصول يتوقف على جودته فإنه من الضرورى الوقوف على موعد الإصابة. فقد لاحظ Broadbent أن جودة الطماطم المصابة بفيروس TMV تسوء بشدة إذا ما أصيبت الطماطم فى موعد متأخر.

وعلى أساس أسعار السوق، فقد تم حساب الخسائر اليومية فى المواعيد المختلفة للإصابة، وفيما يلى ما توصل إليه Broadbent (جدول ١ – ١).

الجدول (١ – ١)

موعد الإصابة	النقص محسوبًا بالوزن ٪	النقص محسوبًا بالجودة ٪
٣ مارس	١٩	١٩
١٤ أبريل	١٨	٢٧
٣١ مايو	١٢	٣٣

وفى ظروف السوق فإن تقدير العلاقة بين النقص فى الوزنين والخسائر اليومية النقدية التى يتكبدها محصول معين تتعقد أكثر إذا ما ثار التساؤل حول مدى إمكانية تطبيق ذلك على مزارع مختلفة . وإذا كان النقص فى المزارع المختلفة متقاربًا.. فإن ثمن المنتج يزيد، وهذا من ناحية أخرى يقلل الخسائر وإذا كانت بعض المزارع تتعرض للضرر أكثر من مزارع أخرى فإن الخسائر اليومية لتلك المزارع تزيد بصورة أكبر.

كما أنه تظهر تعقيدات أخرى حينما نتعرض لبعض أنواع النباتات التى تشكل أحد مكونات البيئة النباتية فى مكان ما . **وكان أوضح مثال على ذلك تلك التجارب التى أجراها كاتراك وجرنيش على حشيشة Cocks feet أو قدم الديك :**

١ – فى الأصيص فى مكان مسقوف.

٢ – فى مكان مفتوح.

٣ – مختلطة مع حشائش أخرى.

ففى القصارى أدت الإصابة الفيروسيه إلى إنقاص محصولها بحوالى ٤٠٪ إلا أن النباتات المصابة، –كان وزن البراعم الفردية أكبر منه فى السليمة، ولذلك كان النقص فى الوزن الجاف غير معنوى. وعند الزراعة فى القصارى شغلت النباتات المصابة والسليمة كل المسطح المتاح. بينما فى المكان المفتوح (الحقل)، حيث يكون نمو الحشيشه أفقيًا أسرع كثيرًا منه فى النباتات المصابة، ومن نتيجة ذلك كان الوزن الجاف فى النباتات المصابة حوالى نصف النباتات السليمة. إلا أنه لوحظ أن النباتات المصابة تزهر مبكرًا، وتعطى كمية أقل من البذور التى كانت حيويتها أقل.

وهذا لم يلاحظ حينما زرعت مختلطة مع حشائش أخرى، حيث يوجد تنافس بين النباتات، وحيث تدخلت عوامل أخرى كثيرة نشأت عن هذا الوضع. ولهذا قام المؤلفان بدراسة صغيرة للحشائش التجريبية، والتى توجد بذورها بالحشيشة المدروسة وكانت نسبة النباتات المصابة بالفيرس صفر، ٥٠، ١٠٠٪.

وعلى مدى عامين مات ٤٤٪ من النباتات المصابة، ٢١٪ من النباتات السليمة، ولو كانت النباتات المصابه والسليمه معًا على البيئة نفسها (الجازون) فإن نقص عدد النباتات

المصابه يساعد بنجاح على نمو النباتات السليمة، إذا تم حش العينة مرة أو مرتين فى الموسم. أما إذا لم يتم ذلك فإن النباتات المصابة تزهر مبكرة معطية أفرعًا رأسية مما يؤدى إلى تظليل النباتات السليمة، التى ما تزال توجد فى المرحلة الخضرية، إلا إذا تم حش هذه النموات الرأسية.

وهذا التنافس لم يوجد فى مثال آخر حينما زرعت حشيشة الراى فى مساحة صغيرة، وأصيب نصف عددها بفيروس التقزم الأصفر فى الشعير؛ حيث تؤدى الإصابة بهذا الفيروس إلى إنقاص عدد البراعم والخلفات، كما تؤدى إلى سرعة توقف نمو النباتات. ومن نتيجة ذلك يقل النمو الجانبى للنباتات المصابة عن السليمة.

جدول (١ - ٢): بعض الأمثلة عن الخسارة الطبيعية فى بعض المحاصيل؛ نتيجة الإصابة بالفيروسات (نقلاً عن حديدى ١٩٩٨).

المحصول	الفيروس	نسبة النقص فى المحصول	المكان
الطماطم	الذبول المبقع TSWV	٧٥-١٠٠٪	(هاواى)
الموز	تورد القمه Bunchy Top	٥٠-٧٠٪	(أمريكا الجنوبية)
التفاح	موزيك Mosaic	٣٠-٤٠٪	
البسلة	الزوائد فى البسلة Pea enation	٥٠٪	
القمح	التقزم الاصفر فى الشعير BYDV	١٠٠٠ كيلو / الفدان	(أمريكا)
القطن	تجعد الأوراق Leaf crumple	٨٠٪	(أريزونا)
العنب	التفاف الأوراق Leaf roll	٥-٨٪	(أمريكا)
الخس	الذبول المبقع فى الطماطم TSWV	٥٠-٩٠٪	(هاواى)
	التقزم الاصفر فى البنجر BYSV	٥٠-٨٥٪	(هوهنولولو)
القرعيات	زكونى - الذبول والموزيك ZYMV & WMV	٤٠-٥٠٪	(كاليفورنيا)
البرتقال	التريستيزا Tristeza	١٠ كيلو / للشجرة	(أسبانيا)
الخوخ	الموزيك Mosaic	٢٠٠ كيلو / للشجرة	(أمريكا)
البطاطس	الموزيك Mosaic	١٨٪	(أمريكا)
الأرز	تانجرو Tungro	١-١٠٠٪	(ماليزيا - اندونيسيا)
بنجر السكر	الاصفرار Yellow	٥-٢٢٪	(أمريكا- انجلترا)

الباب الثانى

التركيب البنائى والكيميائى لفيروسات النبات

STRUCTURAL AND CHEMICAL COMPOSITION OF PLANT VIRUSES

الفصل الأول

التركيب البنائى لفيروسات النبات

STRUCTURAL OF PLANT VIRUSES

من الضرورى جداً توافر معلومات تفصيلية عن التركيب البنائى للفيروسات لعديد من الأغراض فعلى سبيل المثال لمعرفة كيف تحدث الإصابة، وكيف تتضاعف الفيروسات فى الخلية، وكيف تحيا خارج الخلية، وما علاقة الفيروسات المختلفة ببعضها؟ ودراسة التركيب البنائى لفيروس ما تبدأ بدراسة شكل الفيروس.

وأوضحت الدراسات الدراسات الكثيرة المتواصلة أن الجزيئات الفيروسية صغيرة جداً، ولا يمكن رؤيتها، وقد صمم مارتون (Marton, 1934) أول ميكروسكوب إلكترونى، وأخذت أول صورة لفيروس موزيك الدخان (TMV) عام ١٩٣٩. **ووجد بواسطة الميكروسكوب الإلكترونى أن الجزيئات أو الفيريونات الفيروسية تنقسم من حيث الشكل إلى ثلاث مجاميع، وهى:**

١ – مجموعة الفيروسات عصوية الشكل **Rod shaped viruses**.

٢ – مجموعة الفيروسات خيطية الشكل **Filamentous viruses**.

٣ – مجموعة الفيروسات كروية الشكل **Spherical viruses**.

المجموعة الأولى:

كروية الشكل **Spherical shape**، وهى جزئيات كروية صغيرة متلاصقة ومن أمثلتها فيروس موزيك الخيار (CMV)، وفيروس التقزم الشجيرى فى الطماطم (TBSV)، وفيروس نيكروزيس الدخان (TNV).

المجموعة الثانية:

عصوية الشكل **Rod-shape**، وهى جزيئات مستقيمة عصوية مثل فيروس موزيك

الدخان (TMV)، وكذا جزيئات (PVX) فيروس X البطاطس.

المجموعة الثالثة:

خيطية الشكل Filament shape، وهى عبارة عن خيوط طويلة مرنة ملتوية، وقد تكون شبكة تختلف فى درجة نسجها حسب طول الفيروس ومرونته، ومن أمثلتها: فيروس Y البطاطس (PVY) وفيروس موزيك الخيار رقم ٢ (CMV_2) وفيروس موزيك الخس (LMV).

وهناك تقسيم آخر لأشكال الفيروسات بصفة عامة، وهو:

١ – فيروسات متماثلة Isometric viruses، وهى إما مستديرة Spherical أو عديدة الأوجه Polyhedral، وهذه تأخذ الشكل الهندسى Icosahedron، وهو شكل عدد أوجهه عشرون أو مضاعفات العشرين، له ثلاث أنوع من المحاور والتماثل الدائرى (ثلاثية وخماسية وثمانية).

٢ – فيروسات غير متماثلة Anisometric viruses وهى عصوية طولها عدة أضعاف عرضها، ومنها:

أ – فريونات عصوية مستديرة الطرفين Bacillus-Like bodies.

ب – فريونات مستقيمة صلبة Rigid rods.

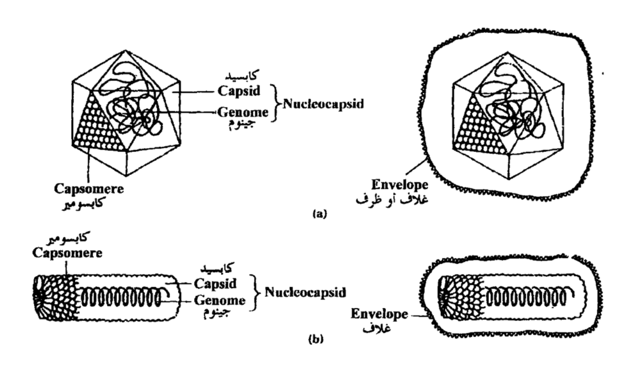
جـ – فريونات خيطية مرنة Flexible threads.

أما الفيروسات الكبيرة والتى يحيطها غلاف فيمكن وصفها فى مجموعتين كالآتى:

١ – فريونات كروية Spherical، مثل: فيروس الذبول المنقط فى الطماطم (TSWV).

٢ – فريونات عصوية Bacilliform أو شبه الرصاصة Bullet shape، مثل: فيروس التقزم الأصفر فى البطاطس (PYDV) والنيكروزيس الأصفر فى الخس (LYNV)، وفيروس الجومفرينا (المدنة)، وفيروس موزيك الذرة (MMV)، وفيروس موزيك وتخطيط القمح (WSMV).

تقاس الجزيئات الفيروسية بالنانومتر (nm)، ويمكن تقدير هذه المقاييس بالدقة الكافية بواسطة الصور المأخوذة بالميكروسكوب الإلكترونى لتحضيرات نباتات مصابة. ومن المعروف أن مقاس جزيئات الفيروسات يختلف اختلافاً كبيراً، ويحتفظ كل فيروس بمقاييسه فمثلاً جزيئات فيروس نيكروزس الدخان (TNV)، قطرها ١٧ نانوميتر، وجزيئات فيروس اللون البرونزى فى الطماطم قطرها ٩٠ نانوميتر، كذلك طول جزيئات فيروس موزيك الدخان (TMV) ٣٠٠ نانوميتر، أما فيروس X البطاطس (PVX) فطول جزيئاته ٥٠٠ نانوميتر، وفيروس اصفرار البنجر خيطى وطول الخيط فيه ١٢٥٠ نانوميتر، بينما طول خيط فيروس تخطيط البسلة ٥٠٠٠ نانوميتر.



شكل (٢ – ١): رسومات تبين الشكل العام لبعض الفيروسات

أ – (a) فيروس (كروي) أيكوزا هيدرال دون غلاف (Macked)، وآخر محاط بغلاف وتظهر الكبسوميرات على وجه واحد من الكابسيد والحمض النووي فهو ملتف ومكثف.

ب – (b) فيروس (خيطي) حلزوني السيمتريه في شكل عارٍ دون غلاف Nacked أو بغلاف Envoeloped والحمض حلزوني والكبسوميرات منسوجة بشكل حلزوني.

أظهرت الدراسات باستعمال الأشعة السينيه (أشعة X) والميكروسكوب الإلكترونى أن الفيروسات تحتوى على حمض نواة واحد، إما DNA أو RNA محاطًا بغلاف بروتينى Protein shell or coat أطلق عليه اسم نيوكليوكابسيد هذا الغلاف البروتينى يتكون من وحدات بنائية يطلق عليها اسم كابسوميرات Capsomeres، وقد تحاط النيوكليوكابسيد فى بعض الفيروسات بغلاف خارجى يطلق عليه ظرف Envelope.

أوضحت التجارب السابقة أن الفيروسات تحتوى على ٥٠ - ٦٠٪ من تركيبها بروتين، والأكثر من ذلك هو إمكانية فصل الحمض النووى عن البروتين وإعادة تركيبهما معا. ولذلك أوضحت التجارب أن هناك طرقاً عديدة مختلفة يترتب بها البروتين حول حمض النواة لحمايته، إلا أنه لوحظ وجود بعض التصميمات المحددة.

وقبل النظر فى التركيب البنائى لبعض الفيروسات، لابد وأن نتذكر الآتى:

أولاً: على الرغم من أن البروتينات فى تركيبها الثانوى تكون فى شكل حلزونى helical إلا أن التركيب الثلاثى لها غير سيمترى أى غير منتظَم، وهذا يرجع بالطبع إلى طبيعة الروابط الأيدروجينية، والكبارى ثنائية الكبريت Disulphids bridges إلى جانب تداخل البرولين فى التركيب البنائى.

ثانياً: قد يظن البعض أن حمض النواة ربما يغلف بواسطة جزئ كبير من البروتين، ولكن هذا لا يحدث إذ إن البروتينات تكون غير مرتبة Irregular فى شكلها، كما تظهر معظم جزيئات الفيروس منتظمة الشكل عند فحصها بالميكروسكوب الإلكترونى.

ثالثاً: إن الشفرة الوراثية الثلاثية Triplet ذات وزن جزيئى يصل إلى حوالى ١٠٠٠ وحدة وزن جزيئى، ولكنها مسئولة عن تكوين حمض أمينى واحد فقط يكون وزنه الجزيئى ١٠٠ وحدة؛ ولهذا فإن حمض النواة يمكنه تمثيل ١٠ / ١ وزنه بروتين. وحيث إن الفيروسات تحتوى على ٥٠٪ بالوزن بروتين؛ فهذا يدل على وجود أكثر من بروتين مميز، وذو وزن جزيئى صغير.

رابعاً: يتضح أنه إذا ما استخدم جزيء البروتين بمفرده كتحت وحدة Subunit كروية أو مستديرة؛ فهذا يحتاج إلى استخدام قليل من المادة الوراثية. وبذلك فليس من الضرورى أن يتركب الغلاف البروتينى بنائيًا من تحت وحدات متشابهة.

خامساً: إن الأوزان الجزيئية لتحت الوحدات المختلفة تكون صغيرة مقارنة بجزئ حمض

النواة التى تحيط به إلى جانب أن بناء الفيروس من تحت وحدات يجعله ثابتاً وراثياً؛ حيث يقلل صغر حجم تحت الوحدات البنائية فرصة حدوث طفرات غير مرغوبة؛ نتيجة لعدم دخول تلك تحت الوحدات غير المرغوب فيها والموجودة على الجين، الذى يمثلها فى تركيب جزئ الفيروس أثناء التجميع.

سادساً: إن العدد الأكبر من الروابط يكون بين تحت الوحدات، وكما ذكر سابقاً أن تحت الوحدات تكون غير منتظمة التركيب، نجد أن تحت الوحدات فى أقل قوة متحررة فيما بينها، وهذا يجعل التركيب البنائى ثابتاً، وبذلك يمكن الحصول على المعلق الفيروسى فى المعمل ولمدة طويلة.

ويخضع نظام وضع حمض النواة وما يحيط به من بروتين إلى نظام معين أو سيمترية معينه نتيجة لتراص تحت الوحدات **Subunits** طبقًا لأسس هندسية بسيطة نسبيًا مبنية على اعتبارات فيزيائية.

وهناك نوعان من نظام التجمع للوحدات البنائية، يؤديان إلى نوعين من السيمترية لبناء النيوكليوكابسيدات هما:

١ - السيمترية الحلزونية Helical symmetry (H) وهى تجمعات حلزونية.

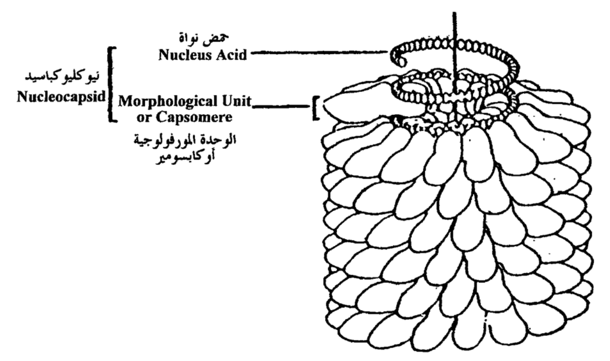
٢ - السيمترية المكعبة Cubical symmetry (C) أو ذات الأوجه المتساوية Sometric symmetry.

وقد وجد أن كل الفيروسات العصويه الشكل التى فحصت هى حلزونية السيمترية أكثر من أن تكون أسطوانية، وأن وجود حمض النواه ربما يكون هو العامل المسبب لهذا الترتيب -كما تظهر نيوكليوكابسيدات بعض هذه الفيروسات أكثر صلابة **rigid** كما فى فيروس موزيك الدخان (TMV)، بينما يوجد فيها ما هو رخو تقريبًا **Flexible** كفيروس موزيك البطاطس (PVX). وهذا دليل على أن الروابط التى تربط الوحدات البنائية تكون فى لفات متعاقبة قوية بالنسبة للفيروس الأول (TMV) وأقل قوة ومتانة بالنسبة للفيروس الثانى (PVX).

بينما الفيروسات الكروية أو الدائرية الشكل، فهى تتبع السيمترية المكعبة، حيث ترتب تحت الوحدات حول رؤوس **Vertices** أو أوجه **Faces** ذات سيمترية مكعبة مثل الرباعية الأوجه **tetrahedron** أو مكعب ذات اثنى عشر (١٢) وجها **Dodecohedron** أو عديد

الأوجه Icosahedron ذات عشرين وجه مثلث متساوى الأضلاع Triangle face وثلاثين حافه Vertices، واثنتى عشر قمة Edges وهو الشكل المميز للفيروسات الكروية ويسمى Icosahedron ايكوزاهيدرال.

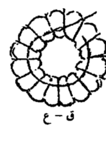
وقد حظى فيروس موزيك الدخان بدراسات واسعة لتركيبه البنائى كمثل للفيروسات ذات السيمترية الحلزونية، وقد وجد أن جزيئات الفيروس تظهر كأسطوانة قطرها ١٥ نانوميتر وطولها ٣٠٠ نانوميتر، وأصبحت هناك صورة واضحة حقيقية، توضح أن الأسطوانة تتكون من وحدات بروتينية (كابسوميرات) تكون متراصة بجانب بعضها البعض، وتتكرر فى شكل حلزونى حول محور الجزئ بفراغ فى وسطها قطرة ٤٠ A° انجستروم والكبسوميرات ذات شكل بيضى Ellipsoid، وتشمل كل لفة على ١٦ كبسوميرة تتكرر كل ٦٩ إنجستروم، ويصل مجموع الكبسوميرات فى الفيريون إلى ٢١٣٠ + ٢٪ والوزن الجزيئى للوحدة ١٧٣٠٠ دالتون.

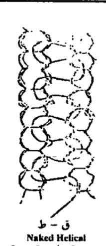


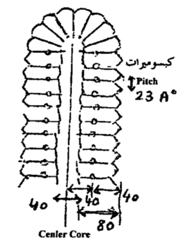
شكل (٢ - ٢): رسم تخطيطي يمثل نيوكليوكابسيد لجزئ فيروس حلزوني السيمترية (TMV).

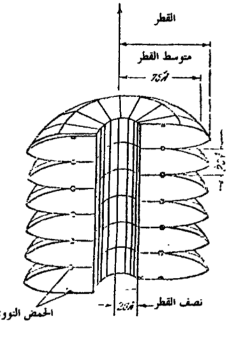
وللفيرون ٣٩ X ٦١٠ دالتون، بينما الوزن الجزيئى لحمض النواه RNA هو ٢,٦ X ٦١٠ دالتون. يكون وسط الجزىء أجوف، وعلى سطحه ترتب تحت الوحدات فى نظام حلزونى ولها Pitch حوالى ٢٣ A° انجستروم ونصف قطر Radial ٧٥ انجستروم (شكل ٢).

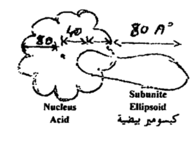


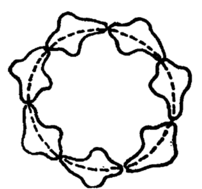






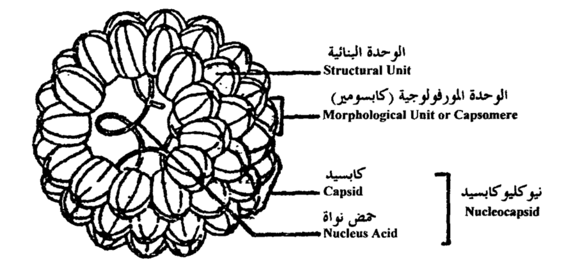






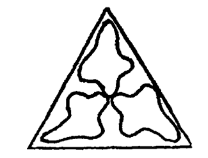
شكل (٢ – ٣): رسم تخطيطى يبين خطوات تجمع الوحدات البنائية فى نظام حلزونى لإنتاج نيوكليوكابسيد فيروس (TMV) موزايك الدخان.

وبالنسبة للسيمترية المكعبة فإن كثير أمن الفيروسات ذات كابسيدات كروية Spheri-cal، تظهر فى الميكروسكوب الإلكترونى ذات أوجه عديدة. وتظهر الوحدات البنائية التى ترى فى الصورة كابسوميرات Capsomeres أو الوحدات المورفولوجية دائرية الشكل أو منشورية مسمطة أو مفرغة. وهذه بدورها تتكون من وحدات أقل، توجد منفردة أو فى مجاميع، والتى هى الجزيئات البروتينية المكونة للجزىء الخاص بغطاء الكابسيد Capsid shell (شكل ٢ – ٤).

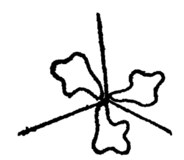


شكل (٢ – ٤): رسم تخطيطي يبين االتركيب البنائي لجزيء فيروس كروي ذى سيمترية مكعبة.

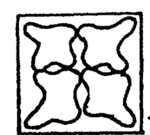
أما معرفة الشكل الذى يوجد فيه حمض النواة داخل الجزيئات الفيروسية ذات السيمترية المكعبة، فهذا غير مؤكد تمامًا، إلا أنه لابد وأن يكون حمض النواة ملتفاً بطريقة ما. أظهر هذا النظام أو الترتيب الداخلى بدراسة مستفيضة لفيروس موزيك اللفت الأصفر (TUMV) على أنه عقد Knobs موجودة فى علاقة سيمترية مع كابسوميرات الغطاء Shell وقطره ١٩٠°A ووسط مفرغ محاط بدائرة من الحمض RNA، والذى بدوره محاط بدائرة خارجية من البروتين.



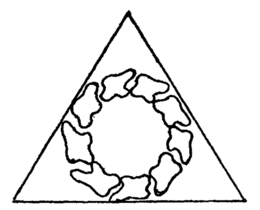
ترتيب تحت الوحدات فى رؤوس المثلث



ترتيب تحت الوحدات حول القمم



ترتيب تحت الوحدات على الاوجه (مربع)



ترتيب تحت الوحدات على أوجه المثلث Nonagons

شكل (٢ – ٥) : الأشكال المختلفة للترتيبات الممكنة للأشياء ذوات الأوجه المثلثة أو المربعة لتكوين السيمترية المكعبة.

وتشمل السيمترية المكعبة عدداً من الأنظمة منها: ذات أربعة أوجه Tetrahedron، وذات ١٢ وجهاً Dodecohedron، وذات عشرين وجهاً Icosahedron.

كما أن نظرية كاسبر وكلج (Casper and Klug, 1962) للأشكال المختلفة للكابسيدات ذات الأوجه فى الصور الإلكترونية، تبدأ باعتبارات بلورية Crystallographic consideration تقول بأن الأنظمة ذات السيمترية المكعبة يمكنها أن تكون أغطية متشابهة Isometric shells وذلك بواسطة وضع وحدات متشابهة فى حالة منتظمة Qui-valent على السطح Sphere، ويمثل نظام سيمترية ايكوزاهيدرال Icosahedral، وفى هذه الحالة فإن (٦٠) ستين تحت وحدة متشابهة ترتبط فيما بينها، وتوضع على سطح دائرى.

الأغلفة Envelopes:

قد تحاط كابسيدات بعض الفيروسات بغلاف خارجى أو أكثر، يطلق عليه الظرف En-velope وتوجد الأغلفة بصفة خاصة فى فيروسات الحيوان، وقليلاً ما توجد فى فيروسات النبات والبكتريا. وقد وجد فى كثير من الحالات أن مادة الأغلفة لها علاقة كيميائية وسيرولوجية ببعض محتويات جدار الخلية، وأظهرت صور الميكروسكوب الإلكترونى لقطاعات فى خلايا مصابة بالفيروس وجود الكبسيدات تحت جدار الخلية مباشرة.

يتكون الغلاف الخارجى من تحت وحدات مرتبة بنظام معين، وقد يكون الغلاف الخارجى مكوناً من طبقة واحدة أو أكثر.

الفيريونات غير الكاملة Incomplete Virions:

وجد أن كل التحضيرات للفيروسات من الخلايا المصابة تحتوى بجانب الفيريونات على محتويات أخرى لها النشاط الفيروسى. وفى معظم الحالات فإن مثل هذه المحتويات ذات علاقة مباشرة مورفولوجية وكيميائية لبعض محتويات الفيريونات. فمثلاً تحتوى النباتات

المصابة بفيروس موزيك الدخان (TMV) على بروتين X، الذى يختلف عن بروتين أ الذى يستخلص من الفيريونات الكاملة.

وفى الخلايا التى تصاب بفيروسات ذات سيمتريات مكعبة، فإنه غالباً ما تصحب بكبسيدات فارغة، كما هو الحال فى فيروس موزيك اللفت، وهذه الكابسيدات الفارغة أخف من الكابسيدات الكاملة، ويمكن فصلها بواسطة الطرد المركزى، وأحياناً ما تحتوى مثل هذه الكابسيدات على كمية قليلة من حمض النواة.

هذه الكابسيدات الفارغة ما هى إلا فيرونات فقدت حمض النواة - أو أغلفة تكونت دون الحمض أو ربما تكونت كبداية لتكوين الفيريونات.

الفصل الثانى

التركيب الكيميائى لفيروسات النبات

CHEMICAL COMPOSITION OF PLANT VIRUSES

لقد دلت الدراسات بأن جميع الفيروسات التى أمكن عزلها بصورة نقية تتكون من بروتين وحامض نووى. لذا يمكن القول بأن جميع الفيروسات المتكاملة تتكون بصورة رئيسية من نوع واحد أو أكثر من البروتينات، ومن نوع واحد فقط من الحامض النووى الذى إما أن يكون من نوع RNA أو DNA.

تختلف النسبة المئوية والوزن الجزيئى للحامض النووى وللبروتين فى الفيروس الواحد باختلاف الفيروسات، ويبين الجدول التالى النسبة المئوية والوزن الجزيئى للأحماض النووية والبروتين لبعض فيروسات النبات.

جدول (٢ - ١) : نوع الحامض النووى والوزن الجزيئى والنسبة المئوية للحامض النووى والنسبة المئوية للبروتين فى بعض فيروسات النبات.

الفيروس	نوع الحامض النووى	٪ الحامض النووى	الوزن الجزيئى للحامض النووى (مليون دالتون)	٪ بروتين
Cauliflower mosaic	DNA	١٦	٤,٧	٨٤
Cowpea mosaic	RNA	٣٣	١,٧	٦٧
Pea enation mosaic	RNA	٢٩	١,٦	٧١
potato X	RNA	٦	١,٠	٩٤
Tobacco mosaic	RNA	٥	٢,٠٥	٩٥
Tobacco necrosis	RNA	٢٠	٦,٦	٨٠
Tobacco ring spot	RNA	٤٠	٢,٠	٦٠
Tomato bushy stunt	RNA	١٧	١,٥	٨٣
Wild cucumber mosaic	RNA	٣٥	٢,٤	٦٥
Wound tumour	RNA	٢٣	١٠,٠	٧٧

أولاً : الحمض النووى :

تتكون الأحماض النووية للفيروسات- كمثيلاتها فى الكائنات الأخرى فى الطبيعة- من سلاسل غير متفرعة من عديد من النيوكليوتيدات Nucleotides، ويتكون كل نيوكليوتيد من جزيئ سكر وقاعدة نيتروجينية وفوسفات.

ويتكون الهيكل الأساسى لهذين النوعين من الحمضين النوويين (DNA , RNA) من سلاسل بها جزيئات فوسفات وسكر خماسى بالتبادل، ويتصل بكل جزىء من جزيئات السكر قاعدة نيتروجينية إما من نوع البيورين أو البريميدين، والسكر الموجود بجزىء الحامض النووى رن ا RNA هو سكر الريبوز، بينما فى جزىء الحامض النووى دن أ DNA فإن السكر الموجود هو سكر دى - أوكسى - ريبوز Deoxyribose، وتعنى انه سكر ريبوز منزوع منه ذرة أوكسجين من ذرة الكربون رقم ٢ . ويوضح الشكل (٢ - ٦ : أ، ب) التركيب البنائى لكل من الريبوز والدى- أوكسى ريبوز.

ومن الملاحظ أن الأحماض النووية تتركب من وحدات متكررة مكونة من قاعدة نيتروجينية (بيورين أو بريميدين) وسكر خماسى (ريبوز أو دى - أوكسى- ريبوز) ومجموعة فوسفات، وكل وحدة من هذه الوحدات المتكررة تسمى «نيوكليوتيد» Nucle-otide، وترتبط النيوكليوتيدات الأحادية ببعضها بواسطة جزئ الفوسفات عن طريق رابطة ثنائية الإستر، مع مكان المجاميع الهيدروكسيلية الموجودة على الكربون الثالث والخامس (٣َ، ٥َ) بالسكر الخماسى، كما يظهر بوضوح فى الشكل (٦ - أ،ب) لكل من رن أ، دن أ والمركب الناتج من ارتباط النيوكليوتيدات Polynucleotides الاحادية يعرف باسم عديدات النيوكليوتيدات.

ويختلف RNA عن DNA من حيث التركيب فى نقطتين، هما :

١ - الاختلاف فى جزئ السكر، حيث يكون من نوع Ribose فى RNA، بينما تكون من نوع Deoxyribose فى DNA.

٢ - يحتوى كل من RNA ، DNA على أربع قواعد نتروجينية منها ثلاث الادنين والجوانين من البيورينات والسيتوزين من البيرميدينات مشتركة بين RNA ، DNA ،بينما تختلف بالنسبة للقاعدة الرابعة، حيث يحتوى DNA على الثيمين، ويحتوى RNA على اليوراسيل.

5' End

أدنين Adenine

سيتوزين Cytosine

جوانين Guanine

يوراسيل Uracil

5' → 3'

etc.

3' End

شكل (٢ : ٦ – أ): التركيب البنائي لسلسلة عديدات الريبونيوكليوتيدات لتوضيح الرابطة ثنائية الاسترين جزيئات سكر الريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات. وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات سكر الريبوز والقواعد النيتروجينية أدنين– سيتوزين– جوانين– يوراسيل.

5' End

أدينين Adenine

سيتوزين Cytosine

جوانين Guanine

ثيمين Thymine

etc.

3' End

شكل (٦:٢ – ب): التركيب البنائي لسلسلة عديدات الدى أوكسى ريبونيو كليوتيدات. لتوضيح الرابطة ثنائية الاستريين جزيئات سكر الدي أوكسى ريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات، وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات سكر الدي أوكسى ريبوز، والقواعد النيتروجينية ادنين– ستيوزين– جوانين– ثيمين.

ومن الحقائق المعروفة اليوم أن الحمض النووى فى الفيروسات هو المادة الوراثية لها؛ حيث يتميز بقدرته على التضاعف وإحداث العدوى، وتصنيع الغلاف البروتينى الخاص بالفيروس.

ولما كان الحامض النووى هو المادة الوراثية للفيروسات، فمن البديهى بأنه كلما زادت كتلة الفيروس والنسبة المئوية للحامض النووى فيها، كان الفيروس أعقد تركيبا.

قد يكون الحامض النووى للفيروس أحادى الخيط (Single- Stranded)، كما هو الحال فى فيروس موزيك الدخانTMV أو ثنائى(Double- Stranded) فى بعض الفيروسات، مثل فيروس تقزم الأرز Rice dwarf virus (RDV) وفيروس أورام الجروح wound tumor vi-rus، وان الحامض النووى لهذه الفيروسات هو من نوع RNA ر ن أ.

فى معظم فيروسات النبات التى درست بصورة جيدة، وجد بأن الحامض النووى فيها كان من نوع RNA، إلا أن هناك بعض الفيروسات التى وجد بأن الحامض النووى فيها كان من نوع DNA.

فقد اكتشف شبرد وزملاؤه فى عام ١٩٦٨ بأن فيروس موزايك القرنبيط Cauliflower mosaic Virus يحتوى على DNA وهو ثنائى الخيط. كما أن أحد الفيروسات التى اكتشفت على الإشنات الزرقاء- الخضراء Blue-Green algae Virus تحتوى على DNA وهو ثنائى الخيط، ووجد أن مجموعة الجيمنىGeminiviruses تحتوى على DNA أحادى الخيط ssDNA مثل فيروس تجعد أوراق الطماطم الأصفر.

ويكون موقع الحامض النووى فى داخل جزئ الفيروس ومحاطاً من جميع جوانبه بالغلاف البروتينى الذى نعتقد بأنه الغطاء الواقى للحامض النووى من تأثير الإنزيمات عليه، وبصورة خاصة إنزيمات النيوكلييز Nuclease التى تقوم بتحليل الأحماض النووية. ولأجل أن يكون هذا الغطاء الواقى فعالاً، يجب أن يكون مقاوماً للإنزيمات التى تحلل البروتينات، والتى تسمى Proteolytic enzymes المتواجدة فى خلايا الكائنات الحية. ويظهر أن الغلاف البروتينى فعلا يتميز بمقاومة هذه الإنزيمات بالنسبة لمعظم الفيروسات التى درست بصورة مفصلة، ويعتقد بأن هذا التركيب للغلاف البروتينى حدث نتيجة للانتخاب الطبيعى، أثناء نشوء وتطور الفيروسات فى الطبيعة.

ثانياً: الغلاف البروتينى أو المحفظة Protein Coat or Capsid:

يشكل الغلاف البروتينى المعروف بالمحفظة Capsid معظم كتلة الفيريون، وخاصة فى الفيروسات الصغيرة (الفيريون Virion هو جسيمة فيروس كاملة؛ أى تحتوى على الحامض النووى والغلاف البروتينى وبقية المكونات الأخرى إن وجدت).

ونظراً لحجم الفيروسات المتناهى الصغير، والذى يترتب عليه صغر حجم مادته الوراثية Genome Size فإن الفيروسات لايمكنها أن تخصص إلا جزءاً محدوداً من مجموع مادتها الوراثية (عدد محدود من الجينات Genes) لبناء بروتين المحفظة، وعلى ذلك فإن المحفظة لابد وأن تتكون- بالضرورة- من وحدات بروتينية متشابهة Identical Protein Subunits والوحدات البروتينية التى تكون الغطاء البروتينى، تسمى الكابسومرات Capsomeres، ومفردها كابسومر Capsomere.

تتكون البروتينات بصورة عامة من سلاسل طويلة وغير متفرعة من البولييبتيدات Pol-ypeptides، وتتكون هذه الاخيرة من وحدت بنائية أساسية هى الأحماض الأمينية Amino acids.

وتحتوى البروتينات المختلفة على حوالى عشرين حمضاً أمينيًا مختلفًا. ويختلف ترتيب هذه الأحماض الأمينية ونسبتها فى البروتينات المختلفة. وترتبط هذه الأحماض الأمينية ببعضها فى سلسلة بواسطة روابط بيبتيدية عن طريق اتحاد مجموعة الكربوكسيل فى أحد الأحماض الآمينية بمجموعة الآمين فى الحمض الآمينى التالى له، مع فقد جزئ ماء. وعند تكوين سلسلة من عدد من الأحماض الآمينية فإنه يطلق عليها اسم سلسلة بيبتيدية. ولكل سلسلة بيبتيدية نهايتان (طرفان)، أحدهما يحتوى على مجموعة كربوكسيل غير مرتبطه وتسمى النهاية الكربوكسيلية، والطرف الثانى يحتوى مجموعة آمينية غير مرتبطة وتسمى النهاية الآمينية. وتتكون البروتينات من سلاسل بيبتيدية ذات عدد مرتفع من وحدات الأحماض الآمينية وللبروتينات مستويات مختلفة من التركيب، تتقدم بتقدم مستوى تعقيد البروتين.

وتسلسل الأحماض الآمينية فى أى بروتين يعتبر على درجة كبيرة من الأهمية. وتغير هذا التسلسل قد يؤدى إلى فقد نشاط البروتين.

ثالثاً : مكونات أخرى Other Constituents :

بالإضافة للبروتين والحامض النووى، فقد وجد بأن بعض الفيروسات تحتوى على مكونات أخرى مثل مركبات البولى آمين Polamines والدهون Lipids، والتى أهمها Phospholipids، وتتميز معظم هذه الفيروسات باحتوائها على غشاء خارجي يحيط بالغلاف البروتينى ويدعى Envelope.

إن وجود هذه المركبات يكون شائعاً فى الفيروسات التى تصيب الحيوان، بينما نجدها مقتصرة على فيروسات قليلة من فيروسات النبات مثل فيروس التقزم الأصفر فى البطاطس Potato yellow dwarf virus، الذى يحتوى على ٢٠٪ مركبات دهنية، وفيروس الذبول المبقع فى الطماطم Tomato spotted wilt V.، الذى يحتوى على ١٩٪ من المركبات الدهنية، ٥٪ كربوهيدرات.

الفصل الثالث

الجينوم الفيروس

VIRAL GENOME

تظهر الأحماض النووية بالفيروسات تنظيمات ملحوظة لأنواع تركيبية وتكوينية تميز كل جزئ فيروسى عن الآخر، **ويمكن القول بأنه توجد أربعة أشكال من الأحماض النووية فى الفيروسات:**

١ - حمض نواة ssRNA وحيد الضفيرة مثل معظم فيروسات النبات.

٢ - حمض نواة ssDNA وحيد الضفيرة مثل فيروس بكتريا القولون M3 q x 174.

٣ - حمض نواة ريبو ds RNA ثنائى الضفيرة مثل فيروس التدرن الجرحى (WTV) وفيروس تقزم الأرز والـReoviruses.

٤ - حمض نواة DNA ثنائى الضفيرة مثل بعض فيروسات الحيوان وفيروس موزيك القرنبيط (CaMV).

وتوجد جميع الأشكال الأربعة ممثلة فى فيروسات الحيوان أما فيروسات النبات فتحتوى على شكل حمض النواة ريبو ويوجد قليل جداً من الفيروسات النباتية التى تحتوى على حمض النواة DNA مثل فيروس موزيك القرنبيط.

وجد أن معظم فيروسات حمض النواة ss-RNA وزنه الجزيئى ٢×١٠^{٦} - ٣×١٠^{٦}، وفى حالة حمض النواة ds RNA فإن الوزن الجزيئى أكبر خمس مرات تقريباً أى ١٠×١٠^{٦}، أما فيروسات حمض النواة DNA فهى ذات وزن جزيئى مرتفع، وتختلف عن فيروسات حمض النواة RNA، إلا أن هناك فيروسات يطلق عليها الفيروسات ذات المحتويات المتعددة Multicomponent، وهى تلك ذات الجزيئات العديدة أو الأجزاء المختلفة من حمض النواة، وحيث إن الجينوم المتعدد يعتبر الآن ضمن هذه الخصائص، إلا أننا سنتناول هنا

الأنظمـة المتعـارف عليـهـا جـيـداً رغـم وجـود حـجج قـوية لانقـسـام الجـينوم فى بعض من الفيروسات مثل فيروس الموزيك والنموات الزائدة فى البسلة (PEMV) وفيروس موزيك وتخطيط الشعير (BSMV)، وتظهر هذه الأنظمة أيضاً فى بعض الفيروسات ذات حمض النواة ds DNA من فيروسات النبات أو الفطر أو البكتيريا .

أولاً : الجينوم الثنائى Bipartite genomes :

١ - مجموعة توبرا فيروس Tobravirus group :

تشمل هذه المجموعة فيروسات عديدة تظهر اختلافاً فى الشكل المورفولوجى مثل فيروس القرقعة فى الدخان (TRV)، وفيروس اللون البنى المبكر فى البسلة (PEBV) ويحتوى الجينوم فيهم على قطعتين غير متساويتين من حمض النواة RNA، موجودة داخل جزيئات أنبوبية وأسطوانية قصيرة أو طويلة نسبياً، وتوجد المعلومات الوراثية الخاصة بعمليات التضاعف فى الجزيئات الطويلة، وأما الجزيئات القصيرة تختص بالتركيب الفردى للبروتين Single structural of protein، لهذا فإن الجزيئات الطويلة معدية، ولكنها تؤدى إلى تكوين حمض نواة RNA غير مغلف ولكنه معدى أيضاً، أما الجزيئات الصغيرة وحمض النواه الذى بها لا يحدث العدوى ولكنها ضرورية لإنتاج الفيريون، ولا يبين تداخل الجزيئات الطويلة والقصيرة لحمض النواة RNA القدرة على إنتاج بعض الفيروسات المختلطة الهجين Hybrid والمحتوى على حمض النواة من سلالات مختلفة، ويحتاج إنتاج مثل هذا الهجين Hybrid إلى عمليات وراثية مختلفة من الإنزيم الخاص لأحماض النواة RNAs .

٢ - مجموعة كوموفيروس Comovirus group :

تحتوى هذه المجموعة على عديد من الفيروسات، تظهر اختلافات فى الكثافة النوعية ينظر إليها على أنها مميزة، ولكن جميعها تميز بجينوم ينقسم بين محتويين من النيوكلوبروتين (وسطى وسفلى)، وهما جزيئات متماثلة Isometric ذات حجم واحد ولكنها تختلف فى كثافتها النوعية عند الترسيب، ويوجد أيضاً جزيئات شبيهة ولكنها فارغة وتظل فى أعلى، أما الغلاف البروتينى بالنسبة لجزيئات الأقسام متشابهة، ويقترح أن

عمليات التضاعف توزع بينهما وأن ليس لجينوم أحدهما القدرة على الإصابة وحده، وكذلك فإن هذا حقيقى لتكوين نوعى البروتين (بروتين فارغ وآخر ممتلئ) وتوجد بعض الوظائف تحدد النسبة بين أنواع الجزيئات، وتظهر بعض المظاهر على أنها مميزة لجينوم واحد .

٣ - مجموعة نيبوفيروس Nepovirus group :

يحتمل أن تحتوى كل أعضاء هذه المجموعة ذات الفيروسات المتماثلة Isometric على جينومات متشابهة مقسمة، ورغم هذا فإنه على الأقل يوجد فيروس واحد يستثنى فى أن له تكوينات من البروتين بدلاً من تركيب واحد، ففى فيروس البقع الحلقية فى الراسبرى (RRSV)، وهو الذى درس أكثر فإن كل الجزيئات ذات حجم متماثل، ولكنها تنقسم إلى ثلاث مجاميع من ناحية الترسيب عاكسة بذلك ما تحتويه من حمض النواة RNA_2، فالجزء العلوى Top يحتوى على كابسيدات فارغة، والجزء الوسطى Middle RNA يحتوى على RNA الذى وزنه الجزيئى ١٫٤ X ١٠^{٦} والجزء السفلى bottom يحتوى على كل من RNA_2 مضافاً إليه RNA_1 ووزنه الجزيئى ٢ X ١٠^{٦} دالتون ولا يمكن RNA_1 أن يعدى وحده وأن RNA_3 ذو تأثير معدٍ ضعيف، وربما يرجع هذا التأثير الضعيف إلى التلوث، أما الحمضان فهما ضروريان للتضاعف .

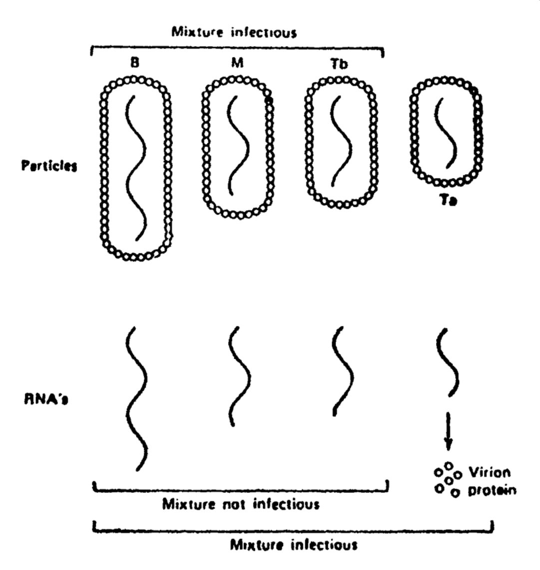
ثانياً : الجينوم الثلاثى Tripartite genomes : وله الأشكال التالية :

١ - فيروس موزيك البرسيم الحجازى Alfalfa Mosaic Virus (AMV) :

وجد اختلاف فى المورفولوجى (فى الطول) . سببت صعوبة عملية فصل هذا الفيروس إلى مجاميعه الترسيبية مشكلة فى تعرف الجينومات التى به بالضبط، ويظهر أن هناك أربعة من الجزيئات يمكن تمييزها تمييزاً بيولوجيا .

كما تحتوى جميع الأشكال على بروتين واحد (البروتين نفسه) . وهى عصوية فى شكلها Bacilliform، ولكنها بأطوال مختلفة فهى أطول فى القاع ثم الوسط ثم القمة أ والقمة ب، وتحتوى هذه الجزيئات على كود حمض RNA لأعمال مخصصة، فالجينومات الثلاثة ذات الحمض الطويل RNA_1 ، RNA_2, RNA_3 تحتوى على كمية الحمض الكافية

للإصابة فهى تحتوى وراثياً على RNA أساساً ولكن لابد من أن يصاحبها RNA_4 الحمض النووى في القمة أو نواتجه Translation وغلافه البروتينى حتى تحدث الإصابة، وفى كلتا الحالتين ينتج RNA_4، ولهذا فإن تتابع النيوكليوتيدات يكون مزدوجاً فى مكان ما فى الجينوم، ولقد اتضح عديد من وظائف الحمض RNA_1, RNA_2, RNA_3 ، بطريقة الترقيم Markers فى إنتاج فيروسات هجن، ولكنه غير معروف أى كود هى الخاصة بالتضاعف (شكل ٢ – ٨).



شكل (٢ – ٨): الأشكال المختلفة لحمض RNA ووظائفها في فيروس موزيك البرسيم (الفالفا) الحجازي.

٢ - مجموعة فيروس التخطيط فى الدخان Tobacco streak virus :

يمثل هذا الفيروس مجموعة من الفيروسات الكروية المتماثلة Isometric ، والتى تشتمل على فيروس موزيك التفاح (APMV) وفيروس تبقع أشجار الدردار (ELm) ريجوس الموالح (CLRV)، كما يوجد العديد من الفيروسات الكروية المتماثلة الغير تامة والتى عزلت أولاً من النباتات الخشبية المعمرة Perennials، وينقسم الجينوم بين أقسام مختلفة من الجزيئات تمثل فيريونات ذات التركيب البروتينى الواحد ونفس نسبة الحمض إلى البروتين، ولكن يختلف الترسيب لاختلاف الحجم، ومن الصعب فصل الجزيئات المختلفة عن بعضها، وأن أقسام الحمض المختلفة يحتمل أنها لا تتمشى مع تصنيف الجزيئات والوضع المعقد لوظائف الجينوم، كما فى فيروس موزيك البرسيم الحجازى (AMV)، وغالباً فإن الجينوم الأساسى يقسم إلى ثلاث أو أربع أصناف من الحمض النووى يطلق عليها من ١ - ٣ تبعاً لصغر الحجم، ولكن حمض RNA_4 أو البروتين المغلف ضرورى لعملية الإصابة، كما أن حمض الـRNA_4 أو الغلاف البروتينى لفيروس التخطيط فى الدخان (TSV) يحل محل المحتويات المتشابهة فى نظام فيروس موزيك البرسيم الحجازى والعكس، وعلى Substitute أساس هذه القواعد فإن هذه الفيروسات ضمت إلى مجموعة فيروس موزيك البرسيم الحجازى (AMV).

٣ - مجموعة البروموفيروس والكيوكوموفيروس

: Bromovirus and Cucumovirus groups

لوحظ أن نيوكليوبروتين هذه الفيروسات ذات حجم متماثل يحتوى على تكوين واحد للبروتين، ويرسب كصنف واحد، ويشمل جينومات غير متطابقة Heterogenicty، وهذا مرتبط مع المحتويات الغير موحدة من الحمض للجزيئات، وتقريباً يحتوى الجينوم الأساسى ثلاثة أصناف فقط من الحمض النووى، وهذه ترقم من ١ - ٣ طبقاً للحجم التنازلى، والحمض النووى الرابع RNA_4، يعمل كرسول mRNA لتكوين الغلاف البروتينى فى نظام تمثيل البروتين الحر فى الخلية، ولكن أصله غير مميز Obscure ولا يظهر أنه يتشابه فى عمله مع الحمض الرابع RNA_4 لفيروس موزيك البرسيم (AMV_2) ولا مع بروتين الغلاف

الضرورى للعدوى، وأظهرت تجارب التهجين Hybridization بواسطة حمض النواة RNA من سلالات ذات قرابة أن RNA_3 (وهو رسول لتكوين الغلاف البروتينى أيضاً) يسبب Mediates تعديلات وسطية فى الغلاف البروتينى، بينما مظاهر إصابة مختلفة تتغير بواسطة حمض النواه ١، ٢، ٣، وأمكن أيضاً تخليق فيروسات مهجنة بواسطة استعمال حمض النواة من فيروسات البروموفيروس Bromoviruses، والتى لها قرابة بسيطة ولكن حدود التخصص فى التهجين غير واضحة.

مما سبق يتضح أن جينوم الفيروسات السابقة (فيروس موزيك البرسيم AMV) ومجموعة البروموفيروس Bromoviruses، والذى يمثلها فيروس موزيك البروم BrMV ومجموعة كيوكوموفيروس Cucumovirus، والذى يمثلها فيروس موزيك الخيار (CMV)، وفيروس التخطيط فى الدخان (TSV)، وفيروس ريجوس ورقة الموالح (CLRV) والفيروس القريب سيرولوجيًا وهو انكسار لون ورقة الموالح (CVV). يتكون حمض النواة RNA لكل هذه الفيروسات من أربعة أنواع أساسية، ثلاثة ذات أوزان جزيئية تتراوح من ٠,٧ – ١,١ X ١٠^٦ دالتون ونوع وزنه الجزيئى حوالى ٠,٣ X ١٠^٦ دالتون وترتب الأحماض النووية RNA (١، ٢، ٣، ٤) فى ترتيب تنازلى بالنسبة للوزن الجزيئى، ويتكون الجينوم فى هذه الفيروسات من ١، ٢، ٣، بينما وضح أن النوع الرابع فى بعضها يحتوى على معلومات وراثية من أجل تكوين الغلاف البروتينى.

وقد وضح أن خليطاً من الحمض النووى (١، ٢، ٣) يكون معديًا فى حالة مجموعة Bromoviruses ومجموعة فيروسات Cucumoviruses، بينما أحماض النواة ريبو من فيروس موزيك البرسيم (AMV) وريجوس ورقة الموالح (CLRV) وفيروس التخطيط فى الدخان (TSV) وفيروس انكسار اللون فى ورقة الموالح (CVV) تحتاج حتى تصبح قابلة لإحداث العدوى تحتاج إلى تنشيط بواسطة غلافها البروتينى، وأن دور الغلاف البروتينى ليس فقط لحماية حمض النواة RNA المعدى أثناء اختراقه الخلايا، حيث إن mRNA للغلاف البروتينى RNA_1 يمكنه أيضاً تنشيط جينوم الفيروس Translation of the RNAs of multicomponent viruses.

عملت دراسة فى جامعة ويسكونسون كلية الزراعة والمياه، اتضح منها الآتى:

حيث إنه من المعروف أن المعلومات الوراثية للفيروسات عديدة الجينوم تتوزع بين الأنواع المختلفة لحمض النواه RNA، فقد وجد أن أصغرها RNA_4، والذى لا حاجة له فى إحداث العدوى يعتبر رسول mRNA لتكوين الغلاف البروتيني، وقد وجدوا أنه بالنسبة لكل الفيروسات العديدة الجينوم، وعندما يستعمل الحمض المركب الكلى ١ - ٤، فإن أصغرها وهو سيسترون الغلاف البروتينى Monocistronic ينقل Transplanted جيداً، ويقترحوا أن حمض النواة ١، ٢ مثل كثير من الرسل لفيروسات الحيوان والثدييات ربما تكون Monocistronic.

والآن حيث عرف التركيب الكيميائى للفيروس.. فإنه من الممكن تفسير كثير من الخواص البيولوجية على المستوى الجزيئى، ويمكن القول: إن هذا الجزئ الصغير من جينوم الفيروس مجهز للقيام بكثير من العمليات، ومن العمليات المستقلة منها رسول منظم Regulated messenger وكوحدة للتضاعف Unit of replication وكمسبب مرضى معدٍ An infective pathogenic agent.

تعرُّف الجينوم الفيروسى:

لتعرف طبيعة الحمض النووى الفيروسى سواء كان DNA أو RNA، وسواء كان وحيد الخيط ss أو ثنائى الخيط ds، وسواء كان مستديراً أو خيطيا، توجد طرق متعددة قياسية طبيعية أو كيماوية أو إنزيمية. وتقوم الطرق الكيماوية والإنزيمية بتعرف التركيب الخاص عند النهاية الخامسة أو الثالثة للحمض النووى الخيطى. كما يعطى استخدام الإليكتروفورسيس نتائج لا بأس بها فى تقدير الوزن الجزيئى للحمض النووى DNA أو RNA عند استخدامها فى صورتها النقية، كما يعطى فكرة عن عدد المناطق المختلفة فى الحجم للجينوم الفيروسى. كما تتعدد الطرق التكنولوجية الحديثة عند تعرف التركيب البنائى للجينوم الفيروسى وعن كيفية تضاعف الفيروسات، وتعتبر دراسة التركيب البنائى للجينوم الفيروسى على جانب كبير من الاهمية فى دراسة الفيروس داخل النبات، وكذا علاقة الفيروس بالفيروسات الاخرى ولكل من ذلك ناحية نظرية وأخرى عملية.

أولاً الفيروس داخل النبات :

من الناحية النظرية فإن معرفة الجينات الفيروسية والنواتج التى تسجلها تعتبر البداية التى توصل إلى تفهم كيف تحدث الفيروسات المرض.

ومن الناحية العملية فإن القدرة على تعريف وعزل جينوم فيروس ما وتتبعها داخل النبات العائل تعطى الفرصة لتفهم وظائف الجينوم الفيروسى وتساعد إلى حد ما فى التوصل إلى طرق مقاومة المرض الفيروسى.

ثانياً : علاقة الفيروس بالفيروسات الأخرى:

من الناحية النظرية فإن معرفة تتابع النيوكليتدات لعدد كبير من الجينوم الفيروسى يعتبر أمراً على جانب كبير من الأهمية فى المساعدة على تقسيم الفيروسات؛ حيث إن التتابع أو ترتيب النيوكليتدات قد يظهر علاقات غير متوقعة بين الفيروسات، كما أن هذه المعلومات تتم بداية بتفهم كيفية بناء الفيروسات، كما أن استخدام الحاسبات الآلية فى مقارنة التتابع النيوكليتيدى بين العديد من الفيروسات وبعضها الاخر، وكذا التتابع المسئول عن البروتين قد يتيح فى بعض الاحيان تعرف وظائف البروتين الفيروس.

ومن الناحية العملية فإن من الأمور الأساسية أن نكون قادرين على تعريف الفيروس وحتى السلالة الفيروسية، قبل أن نستطيع التوصل إلى طرق المقاومة الفعالة للفيروس المسبب للمرض فى محصول معين أو فى منطقة معينة، وتعريف الفيروس يستلزم خطة عمل فعالة لتقسيم الفيروسات المسئولة وسلالاتها، وكذا طرق تعريف الفيروس التى سبق الاشارة إليها، ودراسة التتابع النيوكليتيدى على جانب كبير من الاهمية فى كلا الأمرين.

استخلاص الحمض النووى الفيروسى:

استخلاص الحمض النووى الرايبوزى RNA من التحضيرات النقية والمنقاة جزئيًا وفصله عن الغلاف البروتيني وغيرها من المكونات الفيروسية الأخرى مثل الليبيدات. واغلب الأعمال الأولى التي أجريت على الحمض النووى الفيروسى أغفلت مدى تحمل جزىء RNA، ولهذا فإن الأحماض النووية التى عزلت في ذاك الوقت تعرضت لتهدم شديد،

وحيث إنه ظهر أن الحمض النووى الفيروس هو المسئول عن العدوى، فأصبح من الضرورى فصل الحمض النووى فى صورته المعدية، أو فصل الحمض النووى بصورة أقرب ما تكون إلى الصورة الموجودة عليها فى الجسيمة الفيروسية.

وفى الوقت الحاضر أصبح من الممكن إزالة البروتين الفيروسى وفصل الحمض النووى باستخدام بعض الطرق الكيماوية، ودون أن يطرأ تغير على الحمض النووى أو قدرته على العدوى.

وتوجد مجموعة من العوامل ذات الأهمية القصوى، عند فصل الحمض النووى المعدى، نذكر منها:

١ - تركيز أيونات الايدروجين حيث إنه لايجب استخدام النهايات القصوى لرقم الأس الايدروجينى؛ حيث إنه من الثابت أن رقم الأس الأيدروجينى أعلى من ١٠ يؤدى إلى تحلل الروابط الفوسفوروای إيثير، بينما عند رقم ٣ أو أقل فإن تحرر القواعد البيورينية يتم ببطء.

٢- تأثير الإنزيمات: الحمض النووى الرايبوزى وحيد السلسلة حساس لتأثير إنزيم الرايبونيكلير حيث إنه يكفى كسر فى جزئ الـ RNA، لكى يفقد قدرته على العدوى. ولذلك من الضرورى استبعاد تأثير الإنزيمات عند فصل الحمض النووى الفيروسى. وغالباً ما توجد آثار من إنزيم الرايبونيوكلييز فى التحضيرات المنقاة للفيروس، ويكون مصدرها أوراق النبات.

ومن الضرورى التخلص من هذه الآثار من المحضر الفيروسى، سواء عند التنقية أو عند استخلاص الحمض النووى، وهنا يمكن استخدام مثبطات إنزيم الرايبونيوكليز، كما يمكن تقليل تأثير هذا الإنزيم بتوفير ظروف تقلل من نشاط الإنزيم إلى أدنى حد ممكن مثل درجات الحرارة المنخفضة (صفر -٤ْم)، ورقم الأس الأيدروجينى المناسب، وكذا قوة الأيون.

٣ - فى عمليات المعادن، من الصعب التخلص من الكميات الثقيلة من إنزيم النيوكليز،

ولذلك عند استخلاص الحمض النووى يجب أن يراعى استبعاد الطرق التى تحتاج إلى التحليل المائى طويل المدة، أو الطرق التى تحتاج إلى اعادة الترسيب من المحاليل المائية.

٤ - التأثيرات الهيدروديناميكية: لا تشكل هذه التأثيرات مشكلة بالنسبة للفيروسات الصغيرة، التى تحتوى على RNA وحيد السلسلة. بينما تكون أكثر تأثيراً على الفيروسات التى تحتوى على RNA ثنائى السلسلة.

٥ - القوة الأيونية: فى المحاليل ذات القوة الأيونية الضعيفة، تركيب معقد الحمض النووى الرايبوزى وحيد السلسلة، ويصبح أكثر حساسية لتأثير إنزيم النيوكليز، الذى يوجد عند عملية الاستخلاص، وغالباً تستخلص الـRNA فى محاليل ١ ر٠ مول NaCl كلوريد الصوديوم.

٦ - تجهيز التحضير الفيروسى لاستخلاص الحمض النووى:

تمت المحاولات الأولى لاستخلاص الحمض النووى الفيروسى على فيروس تبرقش أوراق الدخان TMV حيث إن الحمض النووى لهذا الفيروس يوجد داخل غلاف بروتينى على درجة عالية من الثبات، بينما نجد أن الحمض النووى لأغلب الفيروسات الأخرى حتى داخل الجزيئ الفيروسى غالباً ما يتعرض للتهدم، الذى يظهر بدرجات متفاوتة، مع فقد القدرة على العدوى.

وتعتمد الطريقة التقليدية لاستخلاص الحمض النووى الرايبوزى على استخدام الفينول، الا إنه ظهر أن الفينول لا يعطى نتائج مرضية بالنسبة لعديد من الفيروسات، وعند التعرض لاستخلاص الحمض النووى من فيروس غير معروف من قبل، وبمقارنة عدة طرق بغرض اختيار أنسب هذه الطرق بالنسبة لهذا الفيرس، **فيما يلى موجز لأهم هذه الطرق:**

١- المعاملة بالفينول:

ولقد استخدمت هذه الطريقة بواسطة جرير وشرام لاستخلاص الحمض النووى الرايبوزى المعدى من فيروس تبرقش أوراق الدخان TMV؛ حيث إن الفينول يحرر البروتين ويثبط إنزيم النيوكليز. وفى هذه الطريقة يتم خلط معلق الفيروس فى محلول منظم عند pH حوالى ٧،

والذى يحتوى عدة مليميكروجرامات من الفيروس. فى كل ١ سم٣ محلول يخلط مع حجم مساوٍ من محلول مشبع من الفينول فى الماء، ويتم فصل البروتين عن الحمض النووى باستخدام الطرد المركزى، وهنا يظل الحمض النووى فى السائل، ويمكن ترسيب الحمض النووى بعد ذلك بإضافة ضعف الحجم من الإيثانول، ثم يتم التخلص من آثار الفينول باستخدام الإيثانول، ثم يعاد التعليق فى محلول منظم، وتوجد عدة تحويرات لتلك الطريقة؛ حيث إن الطريقة التى تعتبر مناسبة لفيروس ما قد تكون عديمة الجدوى بالنسبة لفيروس آخر فعلى سبيل المثال وجد أنه عند استخلاص الحمض النووى من بعض الفيروسات، يجب استخدام طريقة الفينول ذات المرحلة الواحدة، التى تحتوى على فينول - إيثانول - ماء، أو فينول- مركب آخر للغسيل- ماء. وطريقة الفينول مفيدة عند العمل مع الكميات الضئيلة من الفيروسات؛ حيث إنه بهذه الطريقة يتم التغلب على فقد الحمض النووى فى طبقة البروتين، والذى يحدث عند استخدام طريقة الفينول ثنائى المرحلة.

الحمض النووى الرسول mRNA:

الفيروسات النباتية ذات الجينوم المكون من DNA تؤدى إلى ظهور نشاط الحمض النووى RNA الرسول أثناء عملية التضاعف فى الخلية، وهو الذى يساعد فى إنتاج البروتين الفيروسى Viral Coded Protein، أما الفيروسات النباتية ذات الجينوم RNA وحيد الخيط ssRNA يمكنها بذاتها أن تؤدى دور الحمض النووى الرسول mRNA، ولكن عديداً منها يؤدى إلى ظهور الحمض النووى الرسول، الذى يكون صغيراً Subgenomic m RNA أثناء عملية التضاعف. بالإضافة إلى ذلك فإن الإصابة بالفيروس إما أن تؤدى إلى تنشيط أو تثبيط الحمض النووى الرسول mRNA.

الفصل Isolation:

توجد طريقتان أساسيتان يمكن بهما فصل الحمض النووى الرسول mRNA من الخلايا. فى الطريقة الأولى يتم فصل محتوى الخلية من البولى رايبوزوم Polyribosome fraction، وهو الذى يحتوى على كل الحمض النووى الرسول mRNA، الذى يعمل حقيقة كرسول أثناء عملية الاستخلاص.

وفى الطريقة الثانية تعتمد على حقيقة أنه أغلب أو mRNA تملك قناة من المتبقيات ربما بطول ٣٠–٢٠٠ عند طرفها الثالث، وهذه يمكن إعادة الحصول عليها على عمود فصل ذى تتابع النمو Oligo (T) تلتحم مع poly (A) و RNAs المغايرة فى التتابع تغسل خلال العمود.

النقل فى المعمل : *In Vitro translation*

توجد ثلاثة نظم واسعة الاستعمال لنقل الحمض النووى الرسول mRNA الخاص بذات النواة الحقيقية *Eukaryotic in Vitro* فى المعمل أو على الأقل تحت الظروف التى فيها يتم تمثيل أغلب أو كل البروتين بتوجيه من الحمض النووى الرسول mRNA.

والإطار العام لتطبيق هذه النظم يتم كما يلى:

١ – يتم تنقية الـ RNA أو mRNA المطلوبة على درجة عالية من النقاء باستخدام الطرد المركزى بتدرج الكثافة للفيروس Density gradient Centrifugation.

بينما يكون من الأنسب استخدام البولى أكريلاميدجل إليكتروفوريسيس Polyacrylamide gel electrophoresis بالنسبة للحمض النووى الرسول mRNA:

٢ – تتم إضافة الـ RNA إلى نظام تمثيل البروتين فى وجود الأحماض الآمينية؛ بحيث يكون واحد أو أكثر منها معلماً بالإشعاع.

٣ – بعد أن يتم حدوث التفاعل يتم تصنيف البوليبيبتيدات Polypeptide، باستخدام الإليكتروفوريسيس على (SDS) سلفات دوديسيل الصوديوم، وبولى أكريلاميد جيل مع markers معروفة الحجم.

٤ – يتم وضع المنتج على الجيل بواسطة Incerpcratea radioactivity.

والنظم الثلاثة هى ما يلى:

١ – The rabbit reticulate System.

الخلايا التى تؤخذ من دم الأرانب بعد أن تصاب بالأنيميا تغسل بالماء، ثم تعرض للطرد

المركزى، ثم يعاد استخدام المحلول المعلق.

وهذا يعتبر نموذجاً مفيداً وذلك لغياب نشاط إنزيم RANase .

٢ - Toad oocytes يتم حقن خلايا حية لبيض Xenopus، أو Bufo بواسطة mRNA الفيروس، ويتم تحضينها فى بيئة معلمة.

٣ - The Wheat Germ System : وفى هذا النظام يتم إضافة الـ RNA الفيروس فى وجود معلم مناسب Label إلى معلق، يتم الحصول عليه من مستخلص أجنة القمح الذى أزيل منه الميتاكوندريات.

١ - تهجين الأحماض النووية : Nucleic acid Hybridization

فى الحمض النووى ثنائى السلسلة ds، يكون الخيطان مرتبطين ببعضهما براوبط أيدروجينية بين أزواج القواعد المتقابلة G:C وA:T بالنسبة للحمض النووى DNA وG:C، A:U بالنسبة للحمض النووى RNA ، وحينما يسخن محلول الحمض النووى ثنائى الخيط، فإن الروابط الثانوية بين القواعد تنكسر، وتنفصل الخيوط عن بعضها، ويطلق على هذه العملية عملية الإذابة Melting أو التحلل Denaturation. وعند تحضين مخلوط الخيوط المنفصل على درجة حرارة منخفضة.. فإن الخيوط الثمانية يعاد بناؤها. يطلق على درجة الحرارة التى عندها يتم انفصال ٥٠٪ من الخيوط، اسم درجة الحرارة المذيبة Melting tempretaure أو Tm. ويؤدى تحلل الأحماض النووية فى التركيب الثانى إلى ارتفاع امتصاص المحلول عند ٢٦٠ نانومتر، وهذا يمكن استخدامه لتتبع التحلل واستقرار درجة الحرارة المذيبة، وتتأثر درجة الحرارة المذيبة Tm بعدة عوامل أهمها تركيب القواعد حيث ارتفاع المحتوى من G+C يؤدى إلى رفع درجة الحرارة المئوية، كما أن تركيز الأملاح يؤدى إلى ارتفاع الـTm، كما يؤدى وجود العوامل التى تكسر الروابط الأيدروجينية مثل الفورماليد إلى خفض درجة الحرارة المذيبة بالنسبة لأغلب الأحماض النووية RNA ثنائية الخيط، فان درجة الحرارة المذيبة فى ٠,٣ مول كلوريد صوديوم تقع بين ٨٨ -٩٣ْم. وبالنسبة لاختبار التهجين يتم اختيار الظروف الحرارية بحيث نصل إلى أقصى حد ممكن

للتزاوج بين الخيوط الشقيقة، وقد وجد ان درجة حرارة ٦٥ْم هى الانسب بالنسبة لأغلب RNA الخاصة بفيروسات النباتات أى تكون أقل من درجة الحرارة المذيبة بمقدار من ٢٣-٢٨ْم. ويتم التهجين بين الأحماض النووية فقط تلك التى يكون التتابع النيوكليوتيدى متشابهاً. وتتوقف درجة التقابل حتى يتم التهجين بين نظامين مختلفين على درجة حرارة التفاعل، وهناك قاعدة لذلك حيث تنخفض درجة الحرارة بمقدار درجة واحدة لكل ١٪ من عدم التشابه بين الخيوط. وفى الغالب تستخدم درجة حرارة ٦٥ْم عند استخدام خيوط درجة تشابهها تتراوح بين ٧٢-٧٧٪.

ولذلك يمكن استخدام طريقة التهجين لتعرف مدى التشابه بين خيطين فردين (S.S) من الأحماض النووية ويمكن أن يحدث التهجين إذا كان الحمضان النوويان فى صورة محلول أو عندما يكون أحدهما فى بيئة صلبة مثل أوراق أو أغشية النيتروسيليوز.

٢ - Gel Electrophoresis :

تعتبر طريقة الجيل اليكتروفورسيس طريقة مهمة لفصل وتحديد حجم مكونات الـDNA.

ففى هذه الطريقة يتم سريان تيار كهربائى بطول الجيل، وتوضع الجزيئات المشحونة فى السائل داخل ثقوب فى الجيل، ويتوقف معدل هجرة جزيئات DNA إلى حد كبير على حجمها (الطول). وعلى ذلك فإن الجزيئات الأقصر من DNA بدرجة أقل أثناء مرورها فى الجيل، وعلى ذلك فإنها تتحرك أسرع من الجزيئات الأطول، ويمكن إمرار جزيئات مشعة ذات أطوال معروفه فى مجرى جيل واحد، حيث يمكن فصل مكون الـDNA غير المهدم من الجيل. وهذا التكنيك له تطبيقات عديدة فى دراسة الجينوم الفيروسى والأحماض النووية على وجه العموم. وهناك أنواع مختلفة من الجيل تحتوى على الأجاروز أو البولى أكريلاميد يمكنها أن تحرر شق الأحماض النووية ذات الأحجام المختلفة، فعلى سبيل المثال.. فإنه باستخدام الجيل يمكن فصل من ٣٠٠ -٥٠٠ جزء من حمض DNA وحيد الخيط مختلفة الأطوال فى حدود نيوكليتيدة واحدة.

٣ - الخرائط المحددة Restricting maps:

الإنزيمات الداخلية المحددة Restriction endonuclases تعتبر إنزيمات موجودة فى عدد من الانواع البكترية. وظيفتها فى هذه الخلايا أنها تكتشف وتهدم الـDNA الغريب مثل ذلك الذى يأتى من الفيروسات المعدية. ومن أهم خصائصها البيوكيماوية هى أن لها القدرة على اكتشاف الـ DNA فقط عند عدد محدد من النيوكلتيدات غالبا ما يكون ٤ أو ٨ نيوكلتيدات فى الطول، ويطلق على هذه الخاصية اسم Recognition Sequences وتقوم البكتريا بحماية الـ DNA الخاص بها بإضافة مجموعة الميثيل للقواعد. ولقد تم تمييز أكثر من ١٠٠ من الإنزيمات المحددة، التى تسمح بقطع الـ ds DNA فى مواقع محددة مختلفة. وباستخدام الإنزيمات المحددة التى تسمح بقطع الجينوم الفيروسى فى شكل الـDNA، أمكن اتباع عديد من الاقسام ذات الاحجام المحددة، والتى يمكن فصلها باستخدام جيل اليكتروفوريسيس، ويمكن عندئذ عمل الخريطة المحددة الخاصة بالجينوم موضحة مواقع كل قطع بالمقارنة بآخرين. ومثل هذه الخريطة التى تميز فيروس بعينه، يمكن استخدامها لإعطاء تصور تقريبى لدرجة تشابه جينوم الفيروسات المتقاربة.

٤ - استخدام DNApolymerase:

وكان لسهولة الحصول على هذا الإنزيم (pol 1) ومعرفة طريقة عمله الفضل فى تطوير وظهور العديد من التكنيكات الجزيئية Molecular techniques بما في ذلك تعليم العينات وترتيب النيوكليتيدات فى الحمض النووى DNA.

وقد وجد إنزيم (Pol 1) فى بكتريا E.coli وكذا تداخله فى عملية تضاعف الـDNA. وعند الأخذ فى الاعتبار دراسة الجينوم الفيروسى، فإن أهم مايميزه هو أنه يستقطب فقط deoxy nucleosade triphosphates (d NTPs)، وأنه يستطيع ان يفعل ذلك فقط عند نسخ فورمة الـDNA. ولكى تبدأ عملية التضاعف لابد من وجود البادئ Primer، والبادئ عبارة عن hydrogen -bonded Oligonucleotide مع تزاوج القواعد مع الخيط الأساسى. ومجموعة الكربوكسيل الطرفية الثالثة لابد أن تكون قادرة على التفاعل مع dNTP القادم.

النيوكليتدات لا تضاف إلى المجموعة الكربوكسيلية الخامسة الحرة، وعلى هذا يمكن القول بأن النمو الخيطى الجديد يبدأ من اتجاه ٥ إلى ٣، بالإضافة إلى ذلك فإن لدى pol 1 وظيفتين أخريين، أولهما: أن نشاط الإكسونيوكليز يدخل فى منع القواعد غير الصحيحة أثناء عملية نمو الخيط، وكذلك فإن للنشاط ٥-٣ اكسونيوكليز الذى من وظائفه فى الخلية إزالة البادئات من RNA من الـDNA كما أن نشاط هذا الإنزيم على الحمض النووى أحادى السلسلة يؤدى إلى كسر وإزالة النيوكليتيدة الخامسة، وعند إزالتها يمكن استبدالها بواسطة القدرة الاستقطابية للإنزيم. ويترك الكسر من ٥ إلى ٣ على طول اتجاه الخيط التمثيلى، وتعرف هذه العملية باسم Nick translation، وفى التجارب يتم الكسر فى الـDNA باستخدام DNase بوضعه فى البيئة الخاصة، ولايجب الخلط بين عمليتى Nick trans والـTranslation؛ حيث إن الأخيرة هى العملية التى تقوم بها الريبوسومات والعوائل الأخرى لتمثيل البروتين فى الخلية تحت تأثير mRNA.

٥ - الاحماض النووية المعلمة Labeled nucleic acid probes:

تم استخدام سلسلة من الأحماض النووية المعلمة إشعاعيًا فى عديد من الطرق لدراسة الجينوم الفيروسى، وعملية تضاعف الفيروسات. والحمض النووى المشعة من الممكن أن يكون DNA أو RNA ويمكن معالجة الحمض النووى بعدة وسائل. وفيما يلى أهم الطرق التى يشيع استخدامها لذلك الغرض.

أ - تعليم النهاية End-Labeling:

حيث إن إنزيم Polynuclotide Kinase وجد فى أنواع كثيرة من الخلايا التى تساعد على نقل (ألفا) فوسفور من الأدينوزين تراى فوسفات (ATP) إلى المجموعة الكربوكسيلية الخامسة عند النهاية رقم ٥ لجزئ DNA أو RNA ذات الأطوال المختلفة. فإذا ما تم تعليم الـATP بواسطة الفوسفور المشع ٣٢ فى الوضع ألفا، فإن ذلك سينتقل إلى مجموعة الكربوكسيلة الخامسة لبولى نيوكليتيدة، وبذا يتم تعليم النيوكليتيدة الخامسة من الجزئ. وإذا كان الفوسفات موجوداً أصلاً فى المجموعة الخامسة، فإن لابد من تحريكه قبل عملية التعليم باستخدام إنزيم Alkaline phosphatase حتى يمكن تحرير المجموعة الكربوكسيلية

الخامسة 5-OH.

ب - طريقة **Nick translation** (النقل بالعلامة):

وهى طريقة شائعة لتعليم الـ DNA؛ حيث يستخدم dNTPs المشع، وذلك بإضافته إلى المخلوط الذى يحتوى على الحمض النووى مع تشجيع نمو خيط الحمض النووى باستخدام DNA pol 1 وذلك للحصول على عينة مشعة.

جـ - طريقة **Random priming** (التكوين العشوائى للبادئ):

وتتضمن هذه الطريقة استخدام مخلوط من نيوكلتيدات عشوائية على الـ DNA وحيد السلسلة أو الـ RNA وحيد السلسلة، والتى يتم نسخها فى المعمل ***in vitro*** مع -DNA pol ymerase أو باستخدام Radioactive dNTPs.

د - طريقة **Strand - Specific probes** العينات المميزة للخيط:

وفى هذه الطريقة أيضاً يتم تمثيل الأحماض النووية ***in Vitro*** من الـ dNTPs المشع، وفى أغلب الأغراض يستخدم الـ DNA المعتمد على RNA polymerase (على سبيل المثال من T7 أو Sp6 بكتيريوفاج) ويستخدم الإنزيم لتمثيل الـ RNA المشع ليعطى نسخة من DNA الذى ينمو مساوياً لذلك، الذى يستخلص من بكتريوفاج Sp6 أو T7، وفى هذه الطريقة من الممكن تمثيل أو تعليم خيط واحد من الحمض النووى.

٦ - طريقة ثازرن **Southern Blotting**:

وقد سميت هذه الطريقة باسم E.M. Southern الذى ابتكر هذه الطريقة؛ حيث يتم فصل جزيئات DNA فى آجاروز جيل فى صورة حزم محددة باستخدام الاليكتروفوريسيس.

ثم بعد ذلك يوضع الجيل فوق غشاء من النيتر وسيليولوز أو النايلون. ثم يعامل بصب محلول منظم مناسب موازٍ لاتجاه الإليكتروفوريسيس وفى اتجاه الغشاء. وعملية الـ Blotting تؤدى إلى نقل الـ DNA بطريقة الأسموزية إلى الغشاء، حيث ترتبط مكونة تكرارية لحزم الـ DNA فى الجيل. كما يمكن بعدئذ تعريض عينة مشعة أو معلمة على المرشح، وحينئذ يتم

ارتباط الـDNA ذى الترتيب النيوكلتيدى المشابه مع العينة المشعة. ثم عن طريق التصوير الاوتوراديوجرافى للغشاء يمكن تمييز أى حزم الـDNA مطابقة لتلك الحزم الموجودة فى العينة، ثم يمكن تقدير أو تقييم حجم الـDNA فى الحزم المهجنة باستخدام Marker مناسب.

٧ - طريقة Northern Blotting:

وهو تكنيك مشابه للطريقة السابقة، استحدث للاستخدام بالنسبة للحمض النووى الرايبوزى RNA، واطلق عليه هذا الاسم للتمييز بينه وبين الطريقة السابقة Southern blot-ting. وفى هذه الحالة يتم فصل مخلوط الـRNA الخاص بالفيروس أو الخلية أو كليهما معًا، على أساس الحجم باستخدام أجاروز جيل إليكتروفوريسيس عادة تحت ظروف، لا تسمح أو تمنع تكوين قواعد ازدواجية داخل الخيوط، والتى تؤدى إلى تكوين انحناءات فى الـRNA.

وكما يحدث مع الـDNA يتم تجمع الجيل على أغشية من النايلون أو النيتروسيليولوز التى تقوم بالإمساك بالـRNA. ثم يتم تعريض الغشاء بعد ذلك لمحلول يحتوى على العينة المشعة، ثم بطريقة التصوير الاوتوراديوجرافى، يمكن تمييز أى حزم الـRNA المشابهة للعينة المشعة، وكذلك يمكن تقدير حجمها باستخدام markers فى الجيل.

٨ - طريقة التهجين فى الموقع In Site Hybridization:

فى العادة تتضاعف الفيروسات، وتتجمع فى مواقع محددة داخل الخلايا المصابة. ويمكن تحت ظروف مناسبة يمكن استخدام الـ RNA أو الـ DNA المشع للتهجين مع الحمض النووى للجينوم الفيروسى أو الـRNA أو الرسول mRNA الموجود فى قطاعات دقيقة للخلايا المصابة.

ويمكن تحديد مواقع التهجين باستخدام التصوير الراديواوتوجرافى، ولو تم التعليم بصبغات فلوريسنتية فيمكن استخدام الميكروسكوب.

٩ - تحديد ترتيب النيوكلتيدات فى الـDNA:

معرفة ترتيب وتعاقب النيوكلتيدات فى الجينوم الفيروسى تعتبر أساسًا لتفهم التركيب البنائى وتضاعف الجينوم وكذا علاقته بالفيروسات الأخرى، ولذلك تستخدم الطرق التالية:

أ - Restriction Endonucleases :

من أهم خصائص تلك الإنزيمات هى أن بعضها لا تؤدى إلى القطع المستقيم، ولكنها تقوم بقطع متعدد فى كل سلسلة عند مواقع عدد قليل من النيوكلتيدات متباعدة، وهى القطع المختلفة التى تترك نهايات قصيرة وحيدة الخيط على جانبى كل قطعة. ويطلق على هذه النهايات اسم النهايات المتماسة أو اللاصقة Cohesive ends لأن لها القدرة على التهجين، لتكون زوجاً من القواعد الشقيقة مع نهايات أى جزىء DNA آخر التى يتم قطعها بنفس تلك الإنزيمات Restiction nuclease.

ب - DNA Ligase :

حينما تلتصق نهايتان من جزيئات DNA التى تم قطعها بواسطة الإنزيم القاطع Restrictian بواسطة القواعد المزدوجة فإن النهايات يمكن تحريرها بواسطة إنزيم يسمى DNA Ligase الذي يكون قاعدة فوسفودايتراى بين نهايتى الحامضين النووين DNA.

جـ - DNA Cloning تجمع الـ DNA (كلونة) :

ولتحديد ترتيب النيوكليتدات أو لإجراء عمليات أخرى على الـDNA المنتج بواسطة الإنزيمات القاطعة، من الضرورى أن نكون قادرين على تكبير كميات هذه المشتقات، وهذا يمكن إجراؤه بإدخال الـ DNA فى بلازميد أو بكتيريوفاج، وبعد ذلك تنميتها فى البكتريا أو الخميرة. والبلازميد عبارة عن جزيئات DNA ثنائى السلسلة ds DNA صغيرة الحجم ومستديرة توجد طبيعيًا فى البكتريا والخميرة وتتضاعف داخل العائل. والـDNA الخاص بالبلازميد أصغر بكثير عن DNA الخاص بالبكتريا، ولذا يمكن فصله بسهولة منها. وحينما تستخدم البلازميدات كناقلات فنستخدم أجزاء من DNA الفيرس؛ حيث يتم إدخالها إلى DNA البلازميد.

ثم يتم إدخال جزيئات هجين الـ DNA البلازميدى إلى البكتريا العائل، ثم تترك المستعمرة البكتيرية لتنمو على بيئة صناعية. والبعض فقط من هذه المستعمرات يحتوى على الـ DNA الفيرس المطلوب. **ويتم انتخاب تلك المستعمرات التى تحتوى على DNA**

المحقون بالطريقة التالية:

يحقن الـ DNA الخاص بالبلازميد المستخدم بجين المقاومة للمضادات الحيوية، غالبًا الأمبيسيلين والبلازميد أيضًا يحتوى على جين يسمح بتخمير اللاكتوز. وتوجد الإنزيمات القاطعة لـ DNA مع هذا الجين. وحينما تدخل جزيئات الـDNA الخاصة بالبلازميد إلى البكتريا فإن الأخيرة يتم تنميتها على بيئة تحتوى على المضاد الحيوى، وعلى نسبه من اللاكتوز مما يعطى لوناً أزرق عند التخمر. وهنا فإن الخلايا المقاومة للمضاد الحيوى، وتحتوى على البلازميد هى وحدها، التى يكون لها القدرة على النمو لتكون مستعمرة ومعظم هذه الخلايا قد لا تحتوى على الـDNA المطلوب، وهنا تعطى لونًا أزرق. بينما تكون أى مستعمرة بيضاء تحتوى على جين إنزيم اللاكتوز فقدت حيويتها بإدخال الـ DNA المطلوب.

وأكثر البلازميدات شيوعًا فى الاستخدام، هو للأمين PBR 322 يحتوى على جين المقاومة للأمبيسلين والتتراسيكلين. ومواقع عديدة تخص الإنزيمات القاطعة Restr. nucleases تقع خلال هذه الجينات.

وحينما تدخل قطعة من DNA غريب داخل أحد هذه الجينات، فإن هذا الجين يفقد نشاطه، وحينما يتم إدخال البلازميد إلى البكتريا العائل يمكن حينئذ تعرف المستعمرات المقاومة لأحد المضادات الحيوية والحساسة لمضادات أخرى. والمستعمرات التى تحتوى على الـDNA الغريب المطلوب تنميته فى بيئة كثيفة، ويتضاعف البلازميد مع نمو خلايا البكتريا العائل، ثم يتم تنقية الـDNA الخاص بالبلازميد. ثم يمكن فصل نسخ من الـDNA الأصل من البلازميد، وذلك بالمعاملة ثانية بواسطة Restr. nuclease المستخدم فى حقن الجزىء.

وهناك بعض البكتريوفاجات التى يمكن استخدامها بدلاً من البلازميد لحمل جزء من الـ DNA الغريب إلى داخل الخلية البكتيرية، مثل فاج ١١٣ الذى يصب ***E.coli*** الذى يفيد فى إكثار الـDNA لاستخدامه فى طريقة Sanger dideoxy sequence؛ حيث إن الفاج يسمح بتكوين قالب من الـDNA وحيد السلسلة.

تحديد تتابع النيوكلتيدات فى الـ DNA لجينوم الفيرس:

لقد ظهرت طريقتان أساسيتان لتحديد التتابع فى النيوكلتيدات فى الـ DNA أولهما طريقة ماكسام وجلبرت Maxam and Gilbert، التى تتضمن استخدام تحضير مشع من الـDNA عند النهاية الخامسة، ثم تقسيم المحضر إلى أربع عينات.

ثم تعامل كل عينة على حدة بلطف بمركب كيماوى، والذى يتخصص فى تحطيم نوع واحد من القواعد. مثل G أو نوعين من القواعد مثل C و T، ولكن فى موقع واحد أو مواقع قليلة بتلك القاعدة فى أى جزىء يتم دراسة مخلوط من جزيئات الـDNA حيث يحتوى كل جزىء على نوع خاص من القواعد، التى تتأثر فى موقع واحد، وتعامل كيمائياً حيث يمكن إزالة تلك القاعدة. ثم تفصل الأجزاء المشعة بواسطة جيل إليكتروفوريسيس، وهنا يمكن تحديد ترتيب النيوكلتيدات من الصورة التى تظهر بها الحزم فى الجيل.

أما الطريقة الثانية فقد اكتشفت بواسطة فرد سانجر Fred Sanger، وتعرف بطريقة سلسلة dideoxy. وتعتبر الآن هذه الطريقة هى الطريقة المفضلة لتحديد تتابع النيوكلتيدات فى الحمض النووى الفيروسى، وأساس هذه الطريقة هو أن nucleoside tri-phosphate يحتوى على البنتوز Pentose تفتقر إلى مجموع الأيدروكسيل على كل من الموضعين ٢، ٣ (a dideoxy nucleotide) ولذلك لا تتمكن من تكوين حزمة Phospho-dist مع النيوكلتيد التى تضاف إلى السلسلة النامية فى الاتجاه الثالث. ولذلك فإن تحديد وضع الـdideoxy nucleotide فى السلسلة النامية يحدد اتساع تلك السلسلة.

الباب الثالث

سلالات فيروسات النبات

Plant Virus Strains

سلالات فيروسات النبات

PLANT VIRUS STRAINS

للفيروس – مثل جميع الكائنات – خاصية التوارث، ويؤكد ذلك نجاح الفيروسات فى المحافظة على صفات وأشكال الأمراض الفيروسية خلال فترة طويلة من التاريخ. فمثلاً فيروس موزايك التيوليب الذى يسبب زركشة خاصة على بتلات الأزهار وينتشر بكثرة فى الوقت الحاضر – وجد مرسومًا بأيدى أحد الهولنديين فى القرن السادس عشر Daniel Rabel, 1575. ويرتبط ثبات الصفات الخاصة بالفيروس إلى حد ما بثبات ظروف معيشتها؛ فزراعة التيوليب فى هولندا معروفة منذ زمن بعيد، ولم يطرأ على أسس زراعته تغير كبير إذ إن بيولوجى هذا النبات لم يتعرض لأى تغيير جذرى فى مدة الأربع قرون الماضية.

ويعتبر الفيروس أكثر مسببات الأمراض قابلية للتغيير، وهذا الاستعداد لسرعة التغيير هو نتيجة لتركيبه البسيط نسبيًا ولسرعة تضاعفه واختلافه الكبير فى طريقة معيشته عن باقى المسببات المرضية. وتعطى هذه الصفة للفيروس خاصية إصابة عدد كبير من العوائل، فيمكن القول بأن فيروس موزايك الخيار رقم/ ١ ينجح فى عدوى نباتات ١٩١ جنسًا تمثل ٤٠ عائلة، وفيروس موزايك الدخان TMV يصيب ٢٣٦ جنسًا تتبع ٣٣ عائلة، كما أن فيروس نيكروزيس الدخان TNV له عدد كبير من العوائل ذات الفلقتين، ومن ذات الفلقة الواحدة. ويكون نتيجة لهذا أن تظهر لمعظم الفيروسات النباتية المدروسة سلالات مختلفة.

وقد بدأ باحثو الفيروسات النباتية منذ سنة ١٩٢٥ فى ملاحظة الاختلافات بين السلالات الفيروسية. وكان ماكينى Mckinney 1926 أول من تمكن من فصل سلالة الموزايك الأصفر Yellow mosaic، عن الطراز العادى لفيروس موزايك الدخان، إذ قام بحقن ٤٠٠ نبات دخان بفيروس الموزايك العادى وحفظها على درجة ٢٥°م، ولاحظ بعد ٣–٦ أسابيع ظهور مناطق صفراء، دقيقة، يتراوح قطرها بين ١–٥ ملليمتر على الأوراق المحقونة لأربعة نباتات فقط. ثم قام ماكينى Mckinney بإجراء مزيد من البحث على هذه

السلالة الجديدة، توصل من خلاله إلى حقيقتين مهمتين، هما:

الأولى: ظهور البقع الصفراء على نباتات الدخان المحقونة بفيروس موزايك الدخان العادى، يكون بدرجة أكثر وضوحًا عند استخدام عصير مخفف من الفيروس العادى.

الثانية: وجد أن تركيز السلالة الجديدة الصفراء يكون مرتفعًا جداً فى المناطق الصفراء، ويقل فى الأنسجة المحيطة بها.

ثم أعاد عمليات العزل والتنقية عدة مرات؛ حتى تمكن من الحصول على سلالة الموزايك الأصفر Yellow mosaic من الموزايك العادى للدخان.

وقد فسر ماكينى Mckinney أن هذه السلالة الجديدة قد نشأت من فيروس موزايك الدخان العادى؛ نتيجة لحدوث طفرة فى إحدى جزيئات الفيروس الأصلية، وقد تمكن بعد ذلك من عزل بقية السلالات، والتى قال عنها بأنها كلها نشأت نتيجة حدوث طفرات للفيروس، وتمكن العالم Koch, 1933 من عزل سلالتين جديدتين من فيروس موزايك البطاطس، أطلق على إحداهما التبقع الحلقى Potato Ring spot virus والأخرى سلالة التبقع Mottle virus . وقد تمكن هذا العالم من عزل هذه السلالات والتمييز بينها وبين سلالة تحزم العروق Potato vein Banding.

كما تمكن Price (١٩٣٤) من عزل سلالة جديدة لفيروس موزايك الخيار، تعطى مناطق صفراء لامعة على نباتات الدخان المصابة، وقد تمكن من الحصول على هذه السلالة بإجراء عديد من التمريرات للفيروس الأصلى خلال نبات الفاصوليا، وفى النهاية أمكنه الحصول على سلالة جديدة لا تعطى نقطًا محلية فقط، ولكنها تتبع بإصابة عامة على عكس الفيروس الأصلى، والذى يعطى على نبات الفاصوليا نقطًا محلية فقط.

وقد تمكن Price بعد ذلك من عزل ٧١ سلالة أخرى من موزايك الخيار، ووجد أدلة كثيرة تشير إلى حدوث الطفرة كعامل مهم فى الفيروسات النباتية، تحدث داخل العائل المصاب فقط.

وفى عام ١٩٣٧ تمكن جنسن. Jensen من عزل ١٢ سلالة لفيروس موزايك الدخان

العادى، وذلك بعد أن قام بإجراء عديد من عمليات العزل، التى وصل عددها إلى ٥٥ عزلاً، وفسر جنسن Jensen نشوء هذه السلالات نتيجة حدوث طفرات للفيروس الأصلى.

وبقدوم عام ١٩٤٠ أجمعت النتائج التى توصل إليها العلماء على أن السلالات الفيروسية تنشأ من الفيروس الأصلى نتيجة حدوث طفرات.

ثم تفتح المجال بعد ذلك، واتسعت آفاقه، وظهر الكثير من الحقائق عن السلالات الفيروسية فى النباتات.

وفى عام ١٩٥٥ تمكن لارسون وآخرون Larson et al, 1955 من إحداث طفرة فى فيروس موزايك البطاطس (X) ، وذلك نتيجة لتعريض النباتات المصابة إلى بخار Nitrogen mustard وهذا معروف أنه عامل مولد للطفرات.

وتمكن فرانكل كونرات Frankel Connrat وآخرون ابتداء من عام ١٩٥٦ من إحداث طفرات فى فيروس موزايك الدخان (التبغ) TMV.

الاختلافات الطبيعية والكيماوية بين سلالات فيروس الدخان:

ترتكز الصفات البيولوجية للسلالات الفيروسية على تغيير فى الخواص الطبيعية الأساسية وفى التركيب الكيماوى لها.

وبنيت التفرقة قديمًا على الفروق فى مظهر الاصابة وبعض الخواص الطبيعية الأخرى، فقد فرق Mckinney 1926 سلالة الموزايك الأصفر عن الفيروس الأصلى لموزايك الدخان بما تسببه من مظهر لمناطق صفراء على الأوراق المحقونة. إلا أن Koch, 1933 فرق بين سلالتى التبقع الحلقى والتبقع العادى وسلالة تحزم العروق فى البطاطس بمظهر الإصابة الخارجى وبالنقل الحشرى؛ إذ وجد أن السلالتين الأوليين لا تنتقلان بواسطة المن، بينما تمكن من نقل السلالة الثالثة (تحزم العروق) فى البطاطس بواسطة نوعين من المن *Myzus persicae,* *Macrosiphum Solanifolii* ، كذلك فرق بينهما بالخواص الطبيعية ومقاومتهما لبعض المواد الكيماوية وبسرعة انتقالهما من مكان الحقن إلى قمة النبات.

ووجد Price, 1954 فى دراسة معملية مقارنة لحوالى ٣٥ سلالة لفيروس موزايك الدخان

TMV والفيروس الأصلي اختلافات في النقط التالية:

١ - القدرة على تكوين المناطق الصفراء على الدخان التركي.

٢ - القدرة على تكوين نقط محلية (حساسية الأصناف) على *N. sylvestris*.

٣ - إنتاج النقط الحلقية على الدخان التركي.

٤ - القدرة على إصابة الفاصوليا *Phaseolus vulgaris*.

٥ - إنتاج نقط محلية كبيرة على *N. glutinosa*.

٦ - إنتاج أوراق صغيرة على الدخان التركي.

أي الاختلافات في مظهر الإصابة - كما وجد أن مورفولوجي الفيروس يتغير قليلاً.

كما لوحظ أن بعض سلاسلات فيروس موزايك الدخان تختلف في سرعة حركتها في الصبغات أثناء عملية فصل التحضيرات الفيروسية من عصير النبات.

وظهرت درجات حرارة مميتة بالنسبة لبعض سلالات فيروس X البطاطس تختلف عن درجة الحرارة المميتة بالنسبة للفيروس الأصلي.

ولوحظ أيضًا أن فيروس X البطاطس يختلف اختلافًا بسيطًا في مقاومته لعمل إنزيم التربسين عن بعض سلالاته، بينما يوجد فرق مؤكد في طول الجزئ بين الفيروس وسلالاته. وكتب Knight, 1954 يقول إنه على الرغم من طرق التحليل المحدودة فإنه بناء على تحليل ١٣ سلالة لفيروس موزايك الدخان، يمكن استخلاص الآتي:

١ - يصحب الطفرات للفيروس اختلافات مؤكدة في تركيب البروتين، وهذه الاختلافات تحدث عامة في نسبة الأحماض الأمينية الموجودة، ويمكن أن تحدث الاختلافات أيضًا في الشكل Type لأن إحدى سلالات الفيروس Rib grass strain وجد أنها تحتوي على حامضين أمينيين هيستيدين ومثيونين Histidine and Methionine ، وهما لا يوجدان بتاتًا في سبع من السلالات الأخرى.

٢ - وجد أن السلالات المتقاربة في أصلها أكثر تشابهًا في تركيبها.

٣ - الخلاف فى تركيب البروتين بين السلالات لا تحدده أحماض أمينية محددة بالذات، حيث وجد أن ١٣ سلالة من موزايك الدخان تحتوى على ١٥ حامضًا أمينيًا من الثمانية عشرة.

ويظهر أن الأحماض الأمينية، السيستين والليوسين والبرولين Cysteine & Leucine and Proline هى الثابتة بالنسبة لجميع السلالات.

ولم ينجح فى عمل علاقة بين التغير ومظاهر الإصابة التى تنتج عن هذه أو تلك السلالة. فمثلاً سلالة B_4 تظهر على الدخان مظاهر إصابة يصعب تفريقها عما تظهره السلالة الأصلية TMV ولكن يظهر اختلاف كيماوى ملحوظ فى محتويات الثريونين Therionine والفالين Valine وحامض الأسباراجين Asparagin.

ومن ناحية أخرى فإنه بين سلالة S_1, S_2 اختلاف واضح فى مظاهر الإصابة، علمًا بأنه لم يلاحظ خلاف يذكر فى الأحماض الأمينية.

ولخص كونكل Kunkel الخواص التى يمكن عن طريقها التمييز بين السلالات الفيروسية فى ١٩ خطوة، وهى:

الأعراض، شدة المرض، القدرة على الإصابة، مدة البقاء قادرة على الإصابة، درجة التخفيف النهائية، درجة الحرارة المثبطة للفيروس، كمية ونوع الأحماض الأمينية، المدى الحرارى لتضاعف الفيروس، سرعة الحركة فى أنسجة العائل، ومدى تحولها إلى إصابة جهازية، نوع البقع المحلية الأولية والثانوية، التوزيع الجغرافى، مدى الانتشار، التأثير على كمية الفيروس فى العائل، المدى العوائلى، الناقل الحشرى المختص، مدى حدوث الطفرات والتفاعل السيرولوجى.

نشوء السلالات (الطفرات)

لقد اقترحت عدة نظريات عن تضاعف الفيروس وتكوين الطفرات، إلا أن أحداً منها لم تثبت صحته، كما لم تمثل إحداها الكلمة الأخيرة فى ذلك الموضوع، ولكن هناك نظرية واحدة من السهل تصورها، وهى نظرية Triplate theory.

وتفترض هذه النظرية أن مجموعة من النيوكليوتيدات مكونة من ثلاث قواعد، يمكنها

العمل على إنتاج حمض أميني واحد، وبذلك يمكن أن تكون هناك ٦٤ شفرة، كل منها يتكون من ٣ حروف كالآتي:

AAA	TAA	GAA	GAA
AAT	TAT	GAT	CAT
AAG	TAG	GAC	CAG
AAC	TAC	GAC	CAG
ATA	TTA	GTA	CTA
ATT	TTA	GTT	CTT
ATG	TTG	GTG	CTG
ATC	TGA	GGA	CGA
AGT	TGT	GGT	CGT
AGG	TGG	GGG	CGT
AGC	TGC	GGC	CGG
ACA	TCA	GCA	CCA
ACT	TCT	GCT	CCT
ACG	TCG	GCG	CCG
ACC	TCC	GCG	CCC

Nucleotide Sequences of RNA Codons and Corresponding Amino Acids

ترتيب نيوكليوتيدات حمض RNA والأحماض الأمينية

1st Base	2nd Base				3rd Base
	U	C	A	G	
	phe	Ser	Tyr	Cys	U
	phe	Ser	Tyr	Cys	C
U	Leu	Ser	Ochre	**	A
Leu	Ser	Amber	Trip	G	
	Leu	Pro	His	Arg	U
C	Keu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
	LLeu	Thr	Asn	Ser	U
	LLeu	Thr	Asn	Ser	C
A	LLeu	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

From Crick. Cold Spring Harbor Symposia 31.1: 1966.

وبناء على ذلك وضع ما يعرف بقاموس، أمكن بواسطته أن يترجم لحمض النووى ذو الأربع قواعد إلى لغة ذات عشرين حرفًا، وهى الأحماض الأمينية أى إن الشفرة التى ينشأ عنها حمض أمينى واحد هى عبارة عن قالب Triplate مكون من ٣ قواعد يسمى أيضًا Codon.

ويبين القاموس التالى ترتيب القواعد الثلاث والأحماض الأمينية المقابلة لكل شفرة.

قاموس الشفرة الثلاثية

Three latter genetic cod-word dictionary Sigel et al, 1965.

Amino acid	RNA	Code words		
Alanine	CCG	UCG*	UCG*	
Arginine	CGC	AGA		
Asparagine	ACA	AUA		
Aspartic acid	GUA			
Cysteine	UUG*			
Glutamic acid	GAA	AGU*		
Glutamine	ACA	AGA	AGU*	
Glycine	UGG	AGG		
Histidine	ACC			
Isoleucine	UAU	UAA		
Leucine	UUG	UNG	UNA	umu[(a)]
Lysine	AAA	AAG*	AAU	
Methionine	IGA*			
Phenylalanine	UUU			
Proline	CCC	CCU*	CCA*	CCG*
Serine	UCU	UCC	UGG˙	
Therionine	CAC	CAA		
Tryptophan	GGU			
Tyrosine	AUU			
VaLine	UGU			

* Un Certain whether code is uuG or GGu

** Nred for u uncertain

(a) Codes preferentially for phenylalanine

. Need for G and U uncertain

o Need for uAG uncertain

من هذا يتضح كيف أن مجموعة بسيطة من ثلاث نيوكليوتيدات تقرر نوع الحمض الأمينى المتكون. وإذا تصورنا أن خيط الحمض النووى مكون من ٦٥٠٠ نيوكليوتيدة، يمكننا أن نستنتج كم نوع من البروتين يمكن تكوينه بارتباط عدد من الأحماض النووية.

وقد يكون أحد هذه البروتينات إنزيمًا ضروريًا لإنتاج زيادة من حمض النواة، والآخر ربما يكون هو البروتين الذى سيعطى حمض النواة ويكون جزيئا جديداً من الفيروس.

ومن ذلك أيضًا يمكن التنبؤ بأن أى تغير فى وجود أى قاعدة بسلسلة الحمض النووى سيؤدى إلى انحراف Complementary deviation (طفــرة mutation) فى ترتيب الأحماض الأمينية للبروتين المقابل، **ويمكن أن تحدث مثل هذه الطفرات فى الحالات التالية:**

١ – إذا ما حلت قاعدة محل أخرى، أى تغيير فى وضع الـCode- Triplate sequences .

٢ – إذا أضيفت قاعدة أو أخذت، من سلسلة الحمض النووى.

وحديثًا أمكن تغيير طبيعة النيوكليوتيد كيميائيًا، وكانت هناك حالة مثيرة لبساطتها، وهى عبارة عن استبدال مجموعة أمين ن يد٢ بمجموعة أيدروكسيل (أيد) فى قاعدة، حيث أجرى Frankel-Conrat تجربة استعمل فيها حمض النتروز Nitrous acid؛ إذ بواسطته تمكن من طرد مجموعة الأمين من السيتوزين واحلال مجموعة الأيدروكسيل محلها، وبذلك أصبح الموجود اليوراسيل بدلاً من السيتوزين، وهذا يعتبر تغييراً فى نيوكليوتيدة واحدة.

وإذا افترضنا إضافة كمية قليلة من حمض Nitrous acid إلى جزئ حمض النواة فى فيروس موزايك الدخان بكل احتراس، فإن واحداً أو اثنين من السيتوزين واليوراسيل يمكن إدخالهما فى الجزئ.

وإذا تصورنا أن جزئ حمض النواة فى فيروس موزايك الدخان يتكون من ٦٥٠٠ نيوكليوتيدة. وأن هذا التغيير يتم فى مجموعة واحدة Triplate مثل GAC والتى تصبح GAU. وعلى هذا فعندما يترجم هذا إلى ما يقابله من بروتين بناء على القاموس النظرى، فلا يلاحظ وجود الحمض الأمينى برولين Proline، ولكن يوجد بدلاً عنه حمض ليوسين

Leusine حيث إن GAU هى أساس لليوسين. وبذلك يتغير الشكل المميز لنيوكليوتيدة واحدة، وبذلك فإنه يمكننا التحكم فى إنتاج البروتين الذى يحتوى على ليوسين فى مكان منه، حيث كان يوجد البرولين وبعبارة أخرى يمكن إنتاج طفرة للفيروس.

وهذا ما أجراه فعلاً فرانكل – كونرات Fraenkel - Conrat وآخرون، حيث عزلوا حمض النواة لفيروس موزايك الدخان، وعاملوه بحمض النيتروز Nitrous، وجعلوا حمض النواة المتغير يكون غلافًا جديداً من البروتين.

إلا أنه ليس من السهل عمليًا إنتاج طفرة فيها نيوكليوتيدة واحدة من ٦٥٠٠ متغير، إلا أن الذى حدث فعلاً هى حالة فيها حوالى أربعة متغيرات فى كل السلسلة، ومن ثم فقد أكدت هذه الدراسة حدوث كثير من الطفرات.

ومن هذه التغيرات أمكن تغيير أو استبدال البرولين بالليوسين، وتطبيقًا لهذا فإنه من المعروف أن فيروس موزايك الدخان يحتوى على برولين قرب الطرف، وأن وجود البرولين فى هذا المكان يجعل الفيروس أكثر مقاومة لإنزيمات النبات التى ربما تثبط من نشاطه. ولهذا يمكن أن يلاحظ عند عمل تغير دقيق كيميائى فى حمض النواة للفيروس TMV تخلق سلالة أخرى للفيروس، التى تتميز بكونها أقل ثباتًا less stable من الفيروس الأصلى.

العوامل التى تؤدى إلى تغيير الفيروس – أو إلى إنتاج سلالات فيروسية:

١ – تغير الفيروس أثناء مروره خلال جسم عائله:

إنتاج الفيروس يتم داخل خلايا العائل، وبالتبعية فإن الوسط الذى يعيش فيه الفيروس يتغير من عائل لآخر. **وفى خلايا النباتات التى تتبع بعض الأجناس فإن الفيروس يقابل ظروفاً تجعله يتغير. ويأخذ هذا التغير مظاهر عدة، منها:**

أ – تغير الفيروس الذى يسبب إصابة محلية فتصبح إصابة عامة:

فمثلاً فيروس موزايك الخيار / ١ فى مروره الأول بنبات اللوبيا *Vigna sinensis* يسبب نقطًا محلية، وفى ثامن أو عاشر تمريرة بواسطة النقط المحلية يظهر على الأوراق بقع صفراء، حيث تحتفظ الخلايا بحيويتها، ويتبع هذا مرض عام قد يأتى على حياة النبات. وإذا استمر

فى التمرير فإن الفيروس يتعرض إلى تغير يقلل من درجة تأثيره وأن المرض يصبح موزايك خفيف أقل ضرراً (Price, 1934)، وهذا التغيير مرتبط بتأقلم adaptation الفيروس نحو العائل الجديد.

ب - يظهر التغير بوضوح إذا ما استعمل سلالة قوية Virulent :

فمثلاً بتمرير السلالة العادية من TMV خلال نبات *N. gluca* أو خلال *N.sylvestris* تتعرض للتغير معطية فى الأول سلالة جديدة أكثر شدة (Couxov & Vovk, 1959) more virulent وبعد حقن أوراق *N.glutinosa* بالفيروس بعد التمرير السابق فإنه يعطى نقطًا محلية (نيكروز) كبيرة وتأثيرها قوى، وذات قطر ٣-٤ مرات أكبر مما يعطيه الفيروس قبل تمريره.

جـ - ربما يفقد الفيروس صفة تطفله على العائل الأصلى:

إذا ما مرر فى عوائل جديدة: فمثلاً الاستمرار فى تمرير فيروس X البطاطس فى نباتات الدخان يؤدى إلى أن يفقد الفيروس قدرته على إصابة عائله الأول وهو البطاطس. وقد وجد Matthews, 1949 أن تكاثر بعض سلالات هذا الفيروس فى نباتات الدخان لمدة ١٨ شهراً قلل درجة إصابتها للبطاطس، وأن تكاثرها لمدة ٣٠ شهراً يفقدها نهائيًا صفة إصابة البطاطس.

ولقد حصل أيضًا Black, 1953 على تأكيد النتائج السابقة بالنسبة لبعض سلالات فيروس اصفرار وتقزم البطاطس، فوجد أن هذا الفيروس ينتشر فى الطبيعة بواسطة حشرة Cicadae، ويتضاعف أيضًا فى جسمها كتكاثره فى عائله النباتى، وأثبت بالتجربة أن زراعة سلالة واحدة لمدة ١٢ عامًا وأخرى لمدة ١٦,٥ عامًا فقط فى النبات يفقد السلالتين قدرتهما على إصابة الحشرة عند تغذيتها على نباتات مصابة. وهذا نتيجة لأن السلالتين فقدتا صفة إصابتهما للحشرة نظير تطفلهما هذه المدة الطويلة على النباتات فقط.

٢ - تغيير الفيروس نتيجة لفعل الحرارة:

تغير الفيروس بفعل الحرارة واضح، ففى عام ١٩٣٤ وجد Holmes أنه بزراعة سلالة قوية Virulent من فيروس موزايك الدخان فى قطع من ساق طماطم، وحفظها لمدة ١٥ يومًا فى

جـو رطب على ٣٤°م، وجد أن الفيروس تعرض لتغير كان نتيجته أن عزل سلالة جديدة ضعيفة جداً فى درجة إصابتها لنباتات الدخان، فلم تعط أى مظهر إصابة خارجى فسماها سلالة متخفية masked strain ، كما أنها ذات صفة مقاومة الحرارة فتتكاثر فى عقل ساق الطماطم على درجة ٣٠° م، وهى درجة أعلى من الدرجة القصوى لتكاثر السلالة الأصلية.

ولقد فسر فى ذلك الوقت (١٩٣٤) ظهور السلالة المتخفية والمقاومة للحرارة بأنه نتيجة للانتخاب، فالسلالة المتخفية توجد فى مخلوط الفيروس الأصلى، وأن حفظ القطع المصابة من ساق الطماطم على درجة ٣٤,٥°م يقلل من تكاثر السلالة الأصلية، ويساعد على تكاثر السلالة المتخفية.. إلا أن التجارب المستمرة لكابتزا Kapitsa عام ١٩٥٤ أثبتت أنه تحت تأثير ارتفاع الحرارة يتغير الفيروس، كما لاحظ فوفك Vovk, 1954 أيضاً سلوك التغير على فيروس موزايك الخيار رقم ٢ نتيجة لتأثير ارتفاع الحرارة. وفى هذه الحالة ظهرت سلالة جديدة تتميز بضررها الشديد، فتسبب على نباتات الخيار موزايك أبيض وناصعاً، مع الموزايك الأخضر المميز للسلالة الأصلية.

٣ - التغير بتأثير الإشعاع Radiation:

عند تعريض أوراق الدخان المصابة بفيروس موزايك الدخان العادى إلى اشعة إكس بمقدار ١٢٠٠–١٤٠٠ يسبب تغيير الفيروس، وفى ظل هذه الظروف عزلت ثلاث سلالات جديدة. لوحظ أيضاً تغير الفيروس عندما تعرضت نباتات الدخان قبل حقنها، وفى هذه الحالة يلاحظ أن سبب التغيير يكون نتيجة لتغيير فى ميتابوليزم النباتات التى عرضت، كما وجد أن التأثير يمكن أن يفسر بالتأقلم adaptation.

٤ - التغيير نتيجة الحقن بمزيج من الفيروسات:

أولاً: يمكن القول بأن أهم عامل لتغيير فيروس النبات، هو إصابة النبات بمخلوط سواء أكان لفيروسات ذات أصل واحد أم لفيروسات تختلف وراثياً. فمثلاً لوحظت إصابة بمظاهر إصابة مختلطة، بتكوين مناطق متفرقة بالأنسجة لوحظت فيها مظاهر إصابة لسلالتين جديدتين ظهرت كنتيجة لتغير طرأ على السلالتين الأصليتين.

وتتميز السلالات الأربع باختلاف المحتويات داخل الخلايا الخاصة بكل سلالة، فالسلالة الأولى تكون داخل الخلايا بلورات سداسية فقط، أما السلالة الثانية (التخطيط) فتكون محتويات بلورية مستديرة داخل الخلايا والسلالتين الجديدتين: إحداهما سلالة عقدية أى تسبب محتويات عقدية موزعة بكل الخلية، والثانية سلالة خيطية تكون داخل الخلايا بلورات سداسية صغيرة، ومعظم المحتويات الأخرى باراكريستال خيطية.

وأثبت تحليل المحتويات كيماويًا أن السلالة العقدية ناتجة عن سلالة الموزايك المخططة، أما السلالة ذات المحتويات الخيطية فهى ناتجة عن سلالة الفيروس الأصلية. كما وجد أن السلالتين الجديدتين بعد فصلهما وتنقيتهما فى مزارع نقية وجد أنهما تحتفظان بخواصهما.

يمكن القول بأن التغير بسبب الحقن لخليط من السلالات يكون سببه تغير فى ميتابوليزم النبات.

ولقد لوحظ أنه فى حالة الحقن بخليط من السلالتين يظهر فى الأنسجة المحتويات الخاصة بالسلالتين، أما المحتويات ذات الأشكال الجديدة فإنها تكون قليلة، وربما لا يتعرف عليها إذا ما فحصت بسرعة ودون دقة. ويتضح أنه لابد من وجود علاقة وطيدة بين هذه الفيروسات حيث إنه نتيجة العمل المتبادل بينهما تتكون فيروسات جديدة.

ثانيًا: ويمكن أن يتم التغير أيضًا فى حالة ما إذا كانت محتويات مخلوط الحقن من فيروسات ليست ذات أصل واحد. ولقد حصل Couxov & Kapitza, 1956 على نتيجة تؤكد ذلك، عندما استعملا مخلوطًا للحقن مكونًا من سلالة لفيروس X البطاطس (X_2) latent ، وسلالة من فيروس موزايك الدخان لم تعط أى مظاهر إصابة عند اصابة نباتات البطاطس، ونادراً ما تظهر نقط صفراء على الأوراق العليا وفى حالة الحقن بمخلوط السلالتين (سلالة X_2 مضافًا إليها سلالة موزايك الدخان)، فإن مظاهر الإصابة بالنسبة للموزايك كانت أكثر وضوحًا، وتكونت على الأوراق نقطًا ميتة صغيرة نيكروزية، وأمكن بعد فصل هذه النقط وحقنها فى أوراق نبات الداتورا الحصول على سلالة جديدة، عرفت كسلالة (Virulent X_3) ذات صفة الشدة بالنسبة لعلاقتها بالدخان والداتورا.

وبعمل دراسة سيتولوجية لنبات الدخان المصاب بمخلوط الفيروسين، ثبت أن صفات المحتويات داخل الخلية لكل منهما دائمًا ما تختلط فى الخلايا .

فسلالة موزيك الدخان تكون بلّورات سداسية وسلالة X2 تكون محتويات مستديرة (أجسام X مستديرة) . وفى أول فترة الإصابة فإن المحتويات المتكونة تحتفظ بتشكيلها المميز لها، ولكن بعد ذلك تذوب أجسام X بشدة، وكذلك تتحول البلورات السداسية إلى أشكال غير بلورية، وغالبًا ما تصبح أجزاء صغيرة .

وتعتبر هذه التغيرات كمظهر خارجى للتأثير المتبادل بين محتويات مخلوط الحقن التى تؤدى إلى تغير سلالة X2 .

وتؤدى النتائج السابقة إلى القول بأن الحقن بمخلوط محتوياته ليست ذات أصل واحد، وفى بعض الحالات، يمكن أن تستعمل كعامل من عوامل تغير الفيروس . ومثل هذا المخلوط يوجد بكثرة فى الطبيعة، ولذلك يصح التفكير فى أن هذا العامل يلعب دوراً كبيراً فى تغير وتطور نمو الفيروسات .

٥ - معاملة الفيروس بواسطة المواد المطفرة Mutagenic agents :

استخدم الكثير من المواد الكيميائية والتى ثبت تأثيرها المطفر على كائنات أخرى لمعرفة تأثيرها على الفيروسات، ومن هذه المواد الكيميائية :

أ - حمض النتروز : Nitrous acid

من أكثر المواد الكيميائية التى درس تأثيرها على الفيروسات النباتية وخاصة فيروس موزايك الدخان، ويرجع تأثير هذا الحامض على مجاميع الأمين، ونتيجة لذلك يتحول الأدنين إلى هيبوكسانزين Hypoxanthine والجوانين إلى Oxanthine ويتحول السيتوزين إلى يوراسيل . وعند تناسخ الحامض النووى فإن الأكسانزين يرتبط مع السيتوزين (مثل الجوانين) أما الهيبواكسانزيم فلا يرتبط مع اليوراسيل (مثل الأونيين) وإنما يرتبط مع السيتوزين - اليوراسيل يرتبط مع الأدنيين.

وقد استخدمها Mundry 1959، وSigel, 1960 حيث عامل الأخير تحضيراً من فيروس

موزايك الدخان TMV بحمض النتروز، ثم حقن به نباتات *N.glutinosa* ثم حقن من نقط محلية منفصلة نباتات دخان صغيرة ليختبر وجود الطفرات. فوجد ٤٢ طفرة ناتجة من الحقن بواسطة ١٥٤ نقطة محلية، بينما وجد طفرتان من ١٠٥ نقط محلية فى حالة عدم استعمال حمض النتروز. وبهذا فإن حمض النتروز يشجع تكوين الطفرات بقدر ١٤ مرة فى المتوسط.

ب - ٥ فلوروبوراسيل: 5 flourouracil

وجد أنه عندما يعامل النبات الذى يتكاثر فيه فيروس موزايك الدخان بهذا المركب، أنه يدخل فى تكوين جزء كبير من RNA المتكون. وقد وجد أن هذا المركب يحل محل اليوراسيل فى جزئ RNA، وخلال تناسخ RNA فإن هذا المركب يرتبط مع الجوانين؛ خاصة عندما يكون على الصورة الاينولية بدلاً من السيتوزين.

جـ - هيدروكسيل أمين: Hydroxylamine

يؤثر هذا المركب على RNA الفيروس ويرجع أثره إلى مهاجمته للسيتوزين، وتحويله إلى مركبات شبيهة باليوراسيل تسلك سلوك اليوراسيل.

وهناك مواد أخرى تستخدم بكثرة فى تخليق سلالات صناعية مثل N. bromosucci-namide Propylene وغيرها من المواد الكيماوية التى لها تأثير مطفر على الفيروسات.

د - كذلك استعمال Nitrogen Mustard:

شجع تكوين سلالات لفيروس X البطاطس عند تعريض الأوراق المحقونة لبخاره.

طرق الحصول على سلالة نقية:

لدراسة تغير الفيروس يجب أولاً استخلاص سلالة ذات أصل واحد وحفظها فى مزرعة نقية. وأحسن طريقة تؤدى نتائج لاختبار سلالة ذات أصل واحد، هو استخلاص الفيروس من نقط محلية متكونة نتيجة لإصابة أوراق بعض النباتات، **وتتلخص طريقة النقط المحلية فى الآتى:**

يستخلص العصير المحتوى على الفيروس من الأنسجة، ثم يخفف بالماء إلى نسبة عالية

(١ : ١٠٠٠٠ أو ١ : ١٠٠٠٠٠) ويحقن به أوراق النبات التى تتفاعل مع الإصابة مكونة نقطًا محلية. ونتيجة لتخفيف المستخلص إلى نسبة عالية، يظهر فى الخلية المحقونة عدد غير كبير من جزيئات الفيروس، أو ربما منفردة تتكاثر فى الخلية المحقونة، وتمر إلى الخلايا المجاورة خلال البلازموديزما.

وقد تبدأ الخلايا المصابة فى الموت بعد ٣-٤ أيام، مكونة نقطًا محلية.

وتمثل كل نقطة محلية وسط تكاثر جزئ منفصلاً عن الفيروس، أو عدداً من الجزيئات غير كبير دخلها عن طريق الحقن. فإذا فصلت بقعة محلية وحضر منها مستخلص فإنه يحتوى على سلالة فيروس من جنس واحد.

ولقد أثبتت الاختبارات الخاصة أنه يمكن عزل سلالات نقية من تحضير لمزيج من السلالات الفيروسية، وذلك بطريقة النقط المحلية التى تظهر على نباتات مخصوصة نتيجة لحقنها بالمستخلص بعد تخفيفه. وربما تحتفظ بعض النقط المحلية بخليط من سلالات الفيروس، ولذلك تكرر عملية الحقن من نقطة محلية مرة أخرى أو مرتين للتأكد من الحصول على سلالة نقية.

ويحتفظ بالبقع المحلية التى تفصل من النبات فى آخر تمريره، ومن نسيج كل نقطة محلية يحضر مستخلص منفصل يحقن به نبات يعطى إصابة عامة. ويحتفظ بهذه النباتات كمزرعة نقية للسلالة تستعمل فى التجارب التالية.

وتستعمل هذه الطريقة عند دراسة الفيروسات، التى تؤدى إلى ظهور نقط محلية على نباتات خاصة، مثل فيروس موزايك الدخان الذى يسبب البقع المحلية على أوراق نبات ***N.glutinosa*** ونباتات بعض أصناف الفاصوليا ونباتات ***Datura sp.*** ، وكذلك فيروس **Y** البطاطس الذى يسبب النقط المحلية على أوراق نباتات ***Lycium barbarum***.

ومن الواضح أنه لا توجد لكل الفيروسات عوائل معروفة تعطى نقطًا محلية. ولذلك ففى بعض الحالات يحسن لعزل سلالة نقية:

١ – أن يحقن النبات بتخفيف عالٍ **ultra filtration** من مادة الحقن.

٢ - وأحيانًا يستعمل طريقة الحقن بواسطة إبرة تغمس مرة واحدة فى محلول الحقن، ثم يجرح بها ورقة نبات جرحًا واحداً Single pin-puncture وهكذا.

٣ - تثبيط الفيروس جزئيًا ببعض الكيماويات Partial inactivation with various chemicals.

٤ - التثبيط الجزئى بالحرارة المرتفعة high temperature.

٥ - التجميد أو التعريض للأشعة فوق الحمراء Sub freezing or exposure to ultravio-let light.

التفسير الكيميائى للتطفر:

وجد أن اصفرار بنجر السكر SBY-V بطول ١٣٧٠٠ انجستروم أو أطول قليلاً قادر على الإصابة، بينما يفقد هذه القدرة بالنسبة للجزيئات التى تقل فى الطول ١٠٠°A. الوزن الجزيئى لهذا الفيروس هو ٢ X ١٠^٦، وهو يعادل الوزن الجزيئى لفيروس موزايك الدخان الذى يفقد القدرة على الإصابة، إذا ما أزيل منه حوالى ٥٠–١٥٠ نيوكليوتيدة.

إن عدد النيوكليوتيدات فى حمض موزايك الدخان واللازمة لإحداث الإصابة هو أقل من ٦٠٠٠ نيوكليوتيدة. وحديثًا ظهر أن فيروس تبقع الفول BBNV يفقد القدرة على الإصابة إذا فقد ١٣٠–٣٦٠ نيوكليوتيدة. وأن وزن جزئ فيروس تبقع الفول BBNV هو ٥,٢ X ١٠^٦، ووزن حمض النواة به هو ١,١ X ١٠^٦، ويحتوى الفيروس على ٣٤٠ نيوكليوتيدة.

أما فيروس بروم جراس brome grass وزنه الجزيئى ١ X ١٠^٦، ويحتوى على حوالى ٣٤٠٠ نيوكليوتيدة.

ومن الممكن اعتبار أن عملية الشفرة الوراثية genetic code هى الوحدة العاملة فى سلسلة حمض RNA الفيروسى، وأن السيسترون cistron يتكون على الأقل من مئات النيوكليوتيدات، وهذه كافية كشفرة لتكوين البروتين. وهذا يجعل احتمال أن هناك أكثر من سيسترون لتكوين الفيروس.

ويمكن القول أن:

يتضاعف الفيروس داخل عائلة نتيجة لتداخل اثنين من الجينوم المستقلين: جينوم الفيروس مع جينوم العائل. إذ إن خلية العائل لا يمكنها نتاج فيروس، طالما لم يدخلها جينوم الفيروس وكذلك الفيروس لا يمكنه التضاعف إذا لم يتوافق معه جينوم العائل.

منذ أن عرف أن حمض ريبونيو كليك RNA فيروس موزايك الدخان هو الذى يحتوى على معلومات الإصابة، أخذ تركيب وخواص هذا الحمض الاهتمام الأول، فوجد أنه يحتوى على ٦٥٠٠ نيوكليوتيدة بوزن جزيئى كلى ٢ X ١٠^{٦} (كما وجد جزيئات فيروسية صغيرة فى العائل المصاب إلا أنها غير قادرة على إحداث الإصابة).

ومنذ ذلك عرف أنه لابد من وجود سلسلة بطول معلوم Original length لضمان الإصابة وتضاعف الفيروس. وأكد عمل Ginoza W. 1958 من أن انفصال رابطة فوسفودياستير Phosphdiester bond من ٦٠٠ رابطة ينتج عنه فقدان صفة القدرة على الإصابة. يوضح هذا أيضًا أن التواصل أو الترابط بشكل معين لسلسلة البولينيوكليوتيدات Polynucleotide chain ضرورى لعملية الإصابة.

ويظل سؤال إلى أى مدى تتعامل كل القواعد basis فى السلسلة فعلاً مع المعلومات الوراثية، وإذا ما فقد جزء صغير من طرف سلسلة النيوكليوتيدات تصبح غير قادرة على إحداث الإصابة يحتاج إلى إجابة؟؟ وسيظهر أن المعلومات الوراثية الموجودة فى سلسلة البولينيوكليوتيد لفيروس معين معقدة.

وقد يقترح بناء على ذلك أن أغلب السلسلة تحمل معلومات ضرورية للإصابة، إلا أن بعض المناطق ربما تكون غير ضرورية لهذه العملية. وأن التغيير فى مثل هذه المناطق ربما يكون له تاثير على بعض العمليات دون التاثير على قدرة الإصابة. وستظهر الوقائع أن المعلومات الوراثية الموجودة فى البولينيوكليوتيدات لفيروس معين معقدة - ولمعرفة إلى أى مدى تكون النيوكليوتيدات لحمض النواة حاملة للمعلومات الوراثية، لابد وأن يعرف من الملاحظات الخاصة بالطفرات، كما يحدث عند فقدان القدرة على

الإصابة.

ويمكن الحصول على التأثيرين السابقين تلقائيًا بمعاملة فيروس موزايك الدخان TMV بواسطة حمض النيتروز nitrous acid؛ إذ ينتج عنها فصل Deamination لمجموعة الأمين لتتحول إلى مجموعة هيدروكسيل hydroxyl، دون التأثير على تكامل باقى خيط حمض دن أ الفيروس.

ويوجد فى خيط حمض RNA فيروس موزايك الدخان حوالى ٤٥٠٠ قاعدة.

وربما يؤدى التأثير deamination على مجموعة واحدة من الأمين aminogroup إلى فقدان القدرة على الإصابة. من الممكن إجراء ٣٠٠٠-٣٥٠٠ عملية deamination من ٤٥٠٠ عملية ممكنة، وربما يؤدى إلى هذا التأثير رغمًا عن أن ١٢٠٠-١٥٠٠ مجموعة آمين يمكن فيها الفصل deamination، وأن بعضًا من هذه العمليات deamination ربما يؤدى إلى الطفرات. وأن عملية deamination واحدة تكون كافية لإحداث الطفرة. ولقد وجد أن ثمة عملية أخرى تدخل فى هذه العملية وهى عملية إنتاج طفرات خاصة التى تسبب نقطًا نيكروزيس أكثر من كلوروسيس (الشكل البرى Wild type) دخان جافا Java، ويدخل فى هذه العملية حوالى ١٨٠-٢٠٠ قاعدة أمينية كل واحدة تتسبب عنها طفرة تسبب نيكروزيس.

وقد وجد أن سرعة التطفر الكلية للفيروس تعادل ٨ مرات سرعة تكوين الطفرات، التى تسبب نيكروزيس. وهذا يوضح أن deamination لـ ١٤٠٠-١٦٠٠ قواعد أمينية مختلفة ربما تكون مطفرة. ويتلاءم هذا الرقم مع فكرة أن معظم - إن لم يكن كل - القواعد الأمينية فى حمض فيروس موزايك الدخان تحمل معلومة وراثية ظاهرة. وتأكدت هذه المعلومة بأن وجد أن كل deaminat يكون مؤثرًا للخواص البيولوجية للفيروس.

وكانت نتيجة تجربة معاملة حمض RNA فيروس موزيك الدخان بحامض النيتروز أن تكونت الطفرات. وظهرت أو تأكدت الآراء فى جانب الانتخاب Selection أكثر من الإنتاج الكيميائى للطفرات.

يتكون البروتين من حوالى ٢٠ حمضًا أمينيًا. بعض النيوكليوتيدات ضرورى لتقرير مكان (وضع) حمض أمينى واحد فى سلسلة عديد النيوكليوتيدات، وأن الترتيب الطولى للحمض الأمينى يقرره تتابع النيوكليوتيدات فى حمض النواة.

يتكون الحمض الأمينى الواحد بواسطة وحدة شفرية يمثلها ثلاث نيوكليوتيدات.

وحيث إنه يوجد أربع نيوكليوتيدات فيمكن أن تكون ٤ ^٣^ = ٦٤ شفرة (كما سبق).

ويتكون الحمض الأمينى بواسطة أكثر من شفرة مختلفة، وذلك فى حالة الشفرة غير الكاملة degenerate، أما فى حالة الشفرة الكاملة non degenerate فإن عدد الشفرات المختلفة يساوى عدد الأحماض الأمينية المختلفة الموجودة فى البروتين المتكون.

ويستدل على أن الشفرة غير كاملة non degenerated بطبيعة الحمض الأمينى الموجود فى الغلاف البروتينى لسلالة فيروس موزايك الدخان المتكون نتيجة لتأثير حمض النيتروز.

تتكون النيوكليوتيد من وحدات شفرية ثلاثية، والذى اقترح حديثًا أنها Curious غريبة - كل وحدة تحتوى على الأقل على قاعدة حمض residue-uradylic acid يوراديليك، وبذلك إذا كانت كل شفرة ثلاثية بها قاعدة يوراسيل U واحدة، وأن كل شفرة U حمض فيروس نيكروزيس الدخان المساعدة يحتاجها لتكوين الغلاف البروتينى للفيروس. الجزء المتبقى من حمض النواة فهو خالٍ من حمض U يوراسيل، وبالتبعية لا يحتوى على معلومات خاصة بالبروتين. ويقترح هذا الرأى وغيره أن تواجد اليوراسيل فى كل شفرة ثلاثية ليست لها القدرة على التمثيل mondatory، وحديثًا نشر عن تجارب حمض RNA المكون للبروتين بواسطة العمل فى أنبوبه اختبار ***in vitro***، ووضع قاعدة وهى أن تواجد حمض أمينى incorporation فى سلسلة ببتيدات لا يعتمد على قاعدة اليوراسيل فى كل شفرة.

وحديثًا ظهر أن الشفرة تتكون من اثنين أو أكثر من النيوكليوتيدات، فى شفرة واحدة يكون هناك overlaping إذا ما شاركت نيوكليوتيدة واحدة فى عمل أكثر من حمض أمينى

واحد فى سلسلة البيبتيدات.

لا تنتج الطفرات دائماً من تغييرات فى تكوين الحمض الأمينى المكون للغلاف البروتينى، حتى ولو أظهرت مظاهر إصابة على العائل تغيراً مميزاً. وإذا حصل تبادل متغير فى الحمض الأمينى فيلاحظ عادة تغير واحد وليس متجاورين، وقد سجل أن حمض النيتروز أظهر تبادلاً فى القواعد ١٦ أو ١٧ قواعد الحمض الأمينى المكون لغلاف الفيروس البروتينى.

إن المعلومات الموجودة فى حمض RNA الفيروس ربما تكون معقدة، إذ أنها ربما تتكون من جينات أوسيسترونات genes or cistrons، ولقد وضح وجود جينات على حمض النواة فى البكتريوفاج، وذلك بواسطة تجارب إعادة التركيب recombination. أما أحماض الريبو لفيروسات النبات فيظهر أنها تحتوى أيضاً على جينات، رغم أن معرفة ذلك أخذ طريقاً مختلفاً عن سابقه.

إن فكرة أن خيط حمض ريبوموزايك الدخان يحتوى على عديد من الشفرات cistra تؤكدها الحقيقة التى تقول إن ٢٠٠-٤٥٠ قاعدة أمينية، تشترك فى عمل نيكروزيس على دخان جافا Java. إن التطفر ربما يغير صفة واحدة بينما تظل الصفات الأخرى غير متغيرة. وهذا يبين أن خواص سلالة واحدة لفيروس موزايك الدخان، وربما أيضاً لفيروسات نباتات أخرى تحددها سيترونات cistrons على الحمض RNA. وإذا تقبلنا فكرة أن الشفرة ثلاثية، وإذا أخذنا أيضاً فى الاعتبار أنه لا يحصل خلط overlaping، فإن وحدة البوليبيتيد لشفرة فيروس موزايك الدخان ١٥٨×٣=٤٧٤ نيوكليوتيدة للسيترون الذى يقرر تكوين التركيب البنائى.

لابد من تصور أن السلالات العديدة لفيروسات النبات تعكس أشياء مفيدة لتجارب إعادة التركيب Recombination، التى صممت لتحديد الجينات على خيط RNA. ولسوء الحظ لا توجد ظاهرة واضحة لتبين أن إعادة التركيب تكون بين السلالات القريبة related لفيروسات النبات، رغماً عن أن بعض الملاحظات على فيروسات Tom. Spot W V. وفيروسات TNV, PVX تبين إعادة التركيب.

توابع الفيروس Satellite Agents :

عند تنقية الفيروسات المعزولة من النباتات المصابة، قد يظهر فى التحضيرات النقية نوع من الحمض النووى RNA مغاير للحمض النووى الخاص بجينوم الفيروس. وبعض من هذه الأحماض النووية تسمى تحت الوحدات الجينومية Subgenomic RNA. وبالإضافة إلى ذلك فإن بعض العزلات من بعض الفيروسات النباتية تحتوى على عامل أو عوامل تابعة Sat-ellite agents. ويمكن تمييز نوعين من هذه العوامل على أساس مصدر الغلاف البروتينى المستخدم فى تغليف الحمض النووى RNA؛ أولا الفيروسات التابعة Satellite Viruses، نجد أن الحمض النووى يحمل الشفرة الخاصة بتكوين الغلاف البروتينى Coat protein. وثانيًا فى الـRNA التابع Satellite RNAs فإن الحمض النووى يغلف بقشرة بروتينية تتركب من البروتين المغلف للفيروس المساعد. **وعمومًا فإن الفيروس التابع أو الحمض النووى التابع Satellite virus or RNAs يتميز بالخصائص التالية:**

١ - المادة الوراثية لهما تتركب من حمض نووى رايبوزى وحيد الخيط SSRNA جزيئاته صغيرة الحجم، ولا يكون الحمض النووى RNA جزءاً من جينوم الفيروس المساعد Helper Virus، ولكنه عادة ما يكون محدوداً فى تشابهه مع الفيروس المساعد فى التتابع النيوكلتيدى.

٢ - يعتمد تضاعف RNA على وجود فيروس مساعد خاص.

٣ - هذا العامل يؤثر على أعراض المرض على الأقل فى بعض العوائل.

٤ - تضاعف الفيرس التابع يتداخل لحد ما مع تضاعف الفيروس المساعد.

٥ - الفيروسات أو الأحماض النووية التابعة Satellite تتضاعف فى السيتوبلازم بفضل الحمض النووى الذاتى.

وفى السنوات الأخيرة ظهر أن عديداً من الفيروسات التابعة Satellite المصاحبة لمجموعة من الفيروسات تشبه الفيرويدات فى الخصائص التركيبية، واطلق عليها اسم الفيروسيدات Virusoides، ولكن هذا الاصطلاح سرعان ما عدل عن استخدامه.

الفيروسات التابعة النباتية Satellite plant Viruses :

لقد تأكد وجود ثلاثة فيروسات نباتية تابعة مع مثالين آخرين، يحتمل كونهما فيروسات تابعة. وهذه الفيروسات التابعة هى أصغر الفيروسات المعروفة حتى الآن. وكان أكثر هذه الفيروسات دراسة هو الفيروس التابع نيكروزيس الدخان Satellite tobacco (STNV) necrosis V.، وهو المثال الذى نتناوله بالتفصيل هنا.

الفيروس المساعد Helper لنيكروزس الدخان (TNV) عبارة عن جسم صغير ايكوزاهيدرال بقطر حوالى ٣٠ نانوميتر. ويتضاعف ذاتيًا دون الحاجة إلى فيروسات أخرى، ويصيب فى العادة جذور النبات فى الحقل. بعض التحضيرات من TNV يحتوى على كميات ضئيلة من جزيئات شبة فيروسية بقطر حوالى ١٨ نانوميتر، وتعتمد فى تضاعفها على الفيروس الأكبر. ولقد وجد أن هناك تخصصًا واضحًا فى العلاقة بين الفيروس المساعد والفيرس التابع Helper Virus and Satellite virus، ولقد أمكن عزل سلالات كلا الفيروسين، ولقد وجد أن بعضًا فقط من هذه السلالات الخاصة بالفيروس المساعد Helper، يمكنها أن تنشط سلالات معينة من الفيرس التابع Satellite.

وقد وجد أن كلا الفيروسين التابع والمساعد لنكروزس الدخان تنتقل بواسطة الجراثيم السابحة Zoospore للفطر *Olpidium brassicae* ويعتمد نجاح هذا النقل على توافر عدة عوامل أهمها، هى: سلالة كل من الفيروس المساعد والتابع، وسلالة الفطر، ونوع العائل.

وكان التحديد الكامل للتتابع النيوكلتيدى فى جينوم الفيروس التابع STNV هو من أوائل الفيروسات التى تم فيها تحديد هذا التتابع، ثم تم تحديد تتابع الأحماض الأمينية فى الغلاف البروتينى استنتاجًا من التتابع النيوكلتيدى، ثم بعد ذلك أمكن إثبات ذلك بتحديد التتابع مباشرة فى الغلاف البروتينى للفيروس التابع STNV . ولقد بينت تلك النتائج أن الفيروس التابع يحمل شفرة لجين واحد، هو المسئول عن تكوين الغلاف البروتينى.

كما وجد أن الفيروس التابع STNV لا يحوى أى تشابه معنوى فى التتابع النيوكليوتيدى مع فيروس TNV، كما وجد أن الحمض النووى للفيروس التابع STNV يتمتع بخاصية الثبات الملحوظ داخل العائل؛ حيث وجد أنه يمكنه البقاء فى الأوراق المحقونة

لمدة عشرة أيام فى غياب الفيروس المساعد Helper. وهذه الخاصية تسمح للفيروس التابع بالبقاء حيًا لفترة داخل الخلية دون الغلاف البروتينى، أى قبل أن تصبح الخلية مصابة بالفيروس المساعد.

ولكن الاعتقاد السائد أن الحمض النووى RNA للفيروس التابع STNV يتضاعف مستعينًا بالحمض RNA وإنزيم RNA Polymerase المشفر على الأقل فى جزء منه بواسطة الفيروس المساعد Helper Virus. وتضاعف الفيروس التابع لحد ما يعوق تضاعف الفيروس المساعد TNV، ولهذا فمن الممكن أن يحدث تنافس بينهما للحصول على إنزيم Repli-case، حيث ظهر أن حجم النقط المحلية Local lesion يقل فى حالة وجود الفيروس التابع فى اللقاح، ويعتقد البعض أن ذلك يعود إلى النقص فى تضاعف الفيروس TNV.

ولقد أمكن نقل الفيروس التابع STNV لكل من النباتات، سواء ذات النواة الحقيقية أو غير الحقيقية eukaryotic & prokaryotic.

الحمض النووى التابع Satellite RNA:

وكان فيروس موزايك الخيار Cucumber mosaic Virus (CMV)، والذى غالبًا ما يؤدى إلى ظهور مظهر الريشة Fern leaf فى الطماطم أول من أظهر حمضاً نوويًا SRNA تابعًا تم عزله من الطماطم المصابة بفيروس CMV، والتى كانت تظهر عليها أعراض النيكروزس بجانب مظهر الريشة Fern leaf حيث كان وجود الـ RNA التابع والذى أطلق عليه (CMVRNS) هو المسئول عن زيادة شدة المرض؛ حيث إنه من المعروف أن بعض سلالات فيروس موزايك الدخان وفيروس موزايك الخيار تعطى مظهر الريشة Fern leaf فى الطماطم المنزرعة فى الحقل.

وبعد ذلك ظهر وجود الـ RNA التابع فى تحضيرات عديد من الفيروسات المنتمية لمجموعات Nepovirus: Cucumovirus, Sobemovirus & Tombusvirus. ولقد أمكن حصر ٣٣ حمضًا نوويًا تابعًا Satellite مصاحبة لعدد ٢٩ فيروسًا، ولكنها لا تؤدى دائمًا إلى زيادة شدة المرض. وتختلف الأحماض النووية التابعة عن الفيروسات التابعة Satellite فى أنها لا تحمل شفرة الغلاف البروتينى.

الباب الرابع

تقسيم فيروسات النبات

Plant Viruses Taxonomy

تقسيم فيروسات النبات

Plant Viruses Taxonomy

أخذت عملية تقسيم الفيروسات إلى مجاميع أو رتب وعائلات محاولات كثيرة إلى أن استقرت ووضعت لها قواعد، وقد كان ذلك فى الكونجرس الدولى للميكروبيولوجى عام ١٩٦٦، حيث تكونت لجنة رسمية دولية سميت المجموعة الدولية لتسمية الفيروسات:

International committee on Nomenclature of Viruses (ICNV)

والتى عدلت فيما بعد (١٩٧٥) إلى المجموعة الدولية لتقسيم الفيروسات (ICTV) ووفق على الأخذ بنظام وضعه Lowf, Horne Tournler (L.H.T)، **فوضعت تسمية للفيروسات على الأسس التالية :**

أولا: الفيريون Virion هو أساس التقسيم (الفيريون هو جزئ الفيروس الكامل ذو المقاسات المتعارف عليها والقادر على إحداث الإصابة).

ثانيًا: هناك أربع خواص تستخدم للتمييز بين العائلات المختلفة:

١ – الطبيعة الكيميائية لحمض النواة بالفيريون.

٢ – سيمترية شكل الفيريون.

٣ – وجود الغلاف Envelope من عدمه.

٤ – يميز الفيروسات الحلزونية أبعاد الفيريون، أما الفيروسات المكعبة فيميزها عدد الكابسوميرات بالفيريون.

وبناء على ذلك أمكن تقسيم الفيروسات إلى عائلات، طبقاً للآتى:

أولا: بالنسبة لحمض النواة:

١ – فيروسات تحتوى على حمض نواة DNA.

٢ – فيروسات تحتوى على حمض نواة RNA.

ثانيًا: بالنسبة لسيمترية الشكل:

١ – فيروسات حلزونية Helical (H).

٢ – فيروسات مكعبة Cubical (C).

٣ – فيروسات مركبة السيمترية Binal (B) كما هو الحال فى البكتريوفاج.

ثالثا: بالنسبة لوجود الغلاف Envelop (E) من عدمه:

١ – فيروسات لها غلاف Enveloped. (E)

٢ – فيروسات ليس لها غلاف Non Enveloped. (N)

رابعًا: بالنسبة لحجم الفيريون:

١ – فيروسات عصوية لها طول وعرض.

٢ – فيروسات كروية لها عدد كابسوميرات.

وبناءعلى ما سبق وضع الهيكل الآتى للتقسيم:

قبيلة Phylum	تحت قبيلة Subphyla	قسم Class	رتبة Order	فصيلة (عائلة) Families
Vira	بناء على نوع الحمض النووى DNA or RNA	بناء على سيمترية النيوكليوكابسيد السيمترية Symmetry H.C.B.	بناء على وجود الغلاف من عدمه N.Nacked E.Enveloped Virales	بناء على حجم الفيريون (حجم العصوى وعدد كابسوميرات الفيريون الكروى). Viridae

واستعمل هذا النظام بالنسبة لكل الفيروسات (فيروسات الإنسان والحيوان وفيروسات البكتريا – فيروسات الحشرات) إلا أن علماء فيروسات النبات وجدوا أنه لم يتجمع لديهم

من المعلومات، ما يسمح بتقسيم فيروسات النبات إلى عائلات. ووافقوا على الأخذ بنظام الكريبتوجرام Cryptogram .

تفسير الكريبتوجرام:

يحتوى كل كرايبتوجرام على أربع أزواج من الرموز لكل منها بسطه ومقامه .... و .... و .... و .... وتبين كالآتى:

الزوج الأول :

نوع حمض النواة / عدد الخيوط فى حمض النواة Type of Nucleic acid/No. of strands

رموز حمض النواة :

حمض النواة ريبونيوكليك R = RNA – حمض النواة ديزوكسى ريبونيوكليك D = DNA

رموز عدد الخيوط :

خيط واحد ss = Single - stranded – زوج من الخيوط ds = double-stranded

الزوج الثانى :

الوزن الجزيئى لحمض النواة (بالمليون دالتون) / النسبة المئوية لحمض النواة فى الفيريون

Molecular weight of nucleic acid (in million)/ Percentage of nucleic acid in infective virion

هذا الزوج يعطى تركيب الجزيئات الفعالة، ولكن عندما يكون الفيريون موجوداً فى قطع مختلفة فإنه سيذكر تركيب كل قطعة منفردا فمثلا فيروس القرقعة فى الدخان

TRV: R/1, 2.3/5 + (0.6 - 1.3) / 5.

الزوج الثالث :

يشمل الخطوط الخارجية للفيريون / شكل النيوكليوكابسيد

Outline of particle/shape of nucleocapsid

(النيوكليوكابسيد عبارة عن حمض النواة + البروتين المتصل به) وتستعمل الرموز التالية :

S = Essentially spherical — مستديرة

E = Elongated with parallel sides - ends not rounded — مستطيلة بجوانب متوازية وحواف غير مستديرة

— مستطيلة بجوانب متوازية وحواف مستديرة

U = Elongated with parallel sides, - ends rounded.

X = Complex or none of above — مختلطة أو لم تذكر سابقا

الزوج الرابع :

نوع العائل / نوع الناقل Type of host/Type of vector

رموز نوع العائل :

A = Actinomycetes اكتينومايسيتس — P = Pteridophyta معراة البذور

B = Bacteria البكتريا — S = Seed plant نبات بذرى

F = Fungi فطريات — V = Vertebrate فقاريات

I = Invertebrate لا فقاريات

رموز نوع الناقل:

O = No vector (لا يوجد ناقل) — L = leaf hoppers (نطاطات الاوراق)

A = Aphid (المن)	N = Nematoda (نيماتودا)
B =Beetle (خنافس)	W = White fly (الذبابة البيضاء)
C = Coccidae (قشرية)	I = Ixodoidate
D = Diptera (زوجية الأجنحة)	* = No information (لا توجد معلومات)
E = Eriophidae (العناكب)	G=Gymnocerata
	TH = Thrips (التربس)

وبناء عليه قسمت فيروسات النبات إلى (٣٤) أربعة وثلاثين مجموعة.

وقد أمكن ترتيبها طبقًا لوجود الغلاف من عدمه ثم الحمض النووى ونوعه، ويلى ذلك الشكل الخارجى إلى :

أولا : فيروسات لها غلاف وهى تحتوى على حمض نووى من نوع ss RNA ذى خيط واحد، وتنقسم إلى فيروسات :

أ - ذات شكل عصوى مثل عائلة الـRhabdoviridae.

ب - ذات شكل كروى مثل الفيروسات التابعة لمجموعة الـTospoviruses.

ثانيًا : فيروسات ليس لها غلاف، وبناء على الحمض النووى تنقسم إلى :

أ - فيروسات ذات حمض نووى من نوع DNA وهى إما حمض نووى مزدوج الخيط (ds DNA) مثل الفيروسات التابعة لمجموعة Caulimovirus group، أو حمض نووى وحيد الخيط (ss DNA) مثل الفيروسات التابعة لمجموعة الـGeminivirus group.

ب - فيروسات ذات حمض نووى من نوع RNA وهى إما حمض نووى مزدوج الخيط ds RNA مثل الفيروسات التابعة لعائلة الـReoviridae، أو حمض نووى وحيد الخيط (ss RNA)، **وهذا يقسم طبقا للشكل الخارجى إلى :**

١ - خيطى مثل الفيروسات التابعة لمجموعة الـ

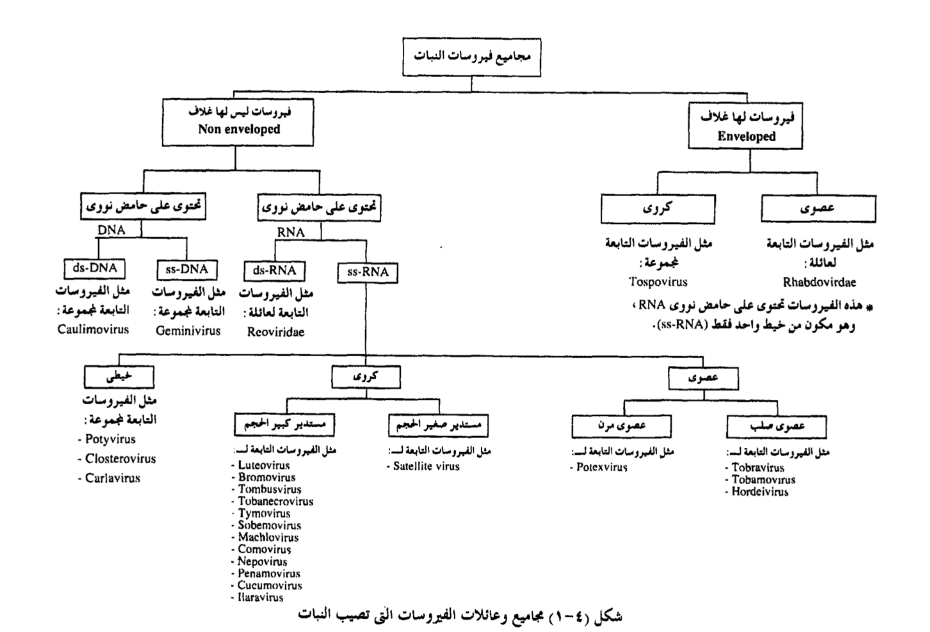
Potyviruses, Closteroviruses, Carlaviruses

٢ – كروى ومنه الكروى الكبير مثل مجاميع:

Cucomoviruses, Nepoviruses

والكروى الصغير مثل الفيروسات المساعدة (المرافقة) Satellite viruses

٣ – عصوى ومنه العصوى المرن Flexable مثل الفيروسات التابعة لمجموعة Potex viruses أو عصوى صلب rigid مثل الفيروسات التابعة لمجاميع Tobraviruses, Tobamoviruses، ويتضح هذا فى التخطيط والصورة المرافقة (الشكل ٤ – ١).



شكل (٤-١) مجاميع وعائلات الفيروسات التى تصيب النبات

وتمت الموافقة فى المؤتمر الدولى التاسع للفيرولوجى المنعقد فى جلاسكو ١٩٩٣ على ما تقدمت به تحت مجموعة فيروس النبات من مقترحات خاصة **بتقسيم فيروسات النبات نجملها فى الآتى:**

أولاً: اتباع نظام التقسيم المعمول به من تقسيم الفيروسات إلى رتب Orders وعائلات Families وتحت عائلة Subfamily وأجناس Genus فى الفيروسات التى اتضحت صورتها التقسيمية، وذلك بدلاً من استعمال الكربتوجرام. **وأن مقياس وضع الفيروس فى مكانه التقسيمى يكون بناءً على التحليلات الآتية:**

١ - خواص الفيريون Virion properties

أ - الخواص المورفولوجية للفيريون.

ب - الخواص الطبيعية.

جـ - خواص الجينوم.

د - تواجد الليبيدات من عدمه.

هـ - تواجد الكربوهيدرات من عدمه.

٢ - تنظيم الجينوم وتضاعفه Genome organization and replication:

أ - تنظيم الجينوم.

ب - استراتيجية التضاعف لحمض النواة replication.

جـ - خواص عملية النسخ Transcription.

د - خواص عملية الترجمة translation وبعد Translation.

هـ - مكان تواجد بروتين الفيروس ومكان تجمعه ومكان نضجه وانطلاقه.

و - سيتوباثولوجى، وتكوين الجسم الداخلى Inclusion body formation.

٣ - الخواص الانتيجينية Antigenic properties

أ - العلاقات السيرولوجية.

ب – الخريطة epitopes.

٤ – الخواص البيولوجية Biological properties

أ – المجال العوائلى – الطبيعى والتجريبى.

ب – العلاقة المرضية الملازمة للمرض.

جـ – الحالة المرضية والتشريح المرضى Tissue tropisms.

د – طريق الانتقال فى الطبيعة.

هـ – العلاقة الحشرية.

و – التوزيع الجغرافى.

وللتوحيد العالمى يتبع الآتى عند كتابة أسماء الفيروس:

١ – لا يكتب الحرف الأول كبيراً not capital.

٢ – لا تستعمل الأقواس italics.

٣ – تحذف كلمة شكل type بل يكتب كالآتى reovirus I. rather than reovirus type I.

٤ – الفصلة لا تستعمل reovirus I not reovirus - I (hyphen).

٥ – لا تنقيط no punctuation .

٦ – لا تستعمل علامات أو اشارات no superscripts.

٧ – لا تكتب الأسماء المختصرة بالحروف acronyms.

٨ – لا تستعمل الأقواس italics فى حالة الأسماء المركبة، والتى تشمل العائل النباتى أو اسم الحشرة.

أشياء عامة:

١ – لا تقسيم للفيروسات المصاحبة ولكن توضع فى قائمة تشمل المعلومات عنها.

٢- تعريف نوع الفيروس species definition

A polythetic class of viruses that constitutes a replicating Linkage and occupies a particular ecological niche.

قسم من الفيروسات، والتى تحتوى على تضاعف الطولى وتشمل خاصية مميزة.

٣ - تعريف الجنس والعائلة The Genus and family definition

A population of V. species that share common characteristics and are different from other population of species.

مجموعة من أنواع الفيروس التى تشترك فى الخواص العامة، تختلف عن بعضها فى افراد الأنواع.

٤ - واشتمل تقسيم فيروسات النبات على:

٢٠ رتبة	20 Order	وتكون التسمية كالآتى:
٥٠ عائلة	50 Families	Genus - Virus
٩ تحت عائلة	9 Sub families	Subfamily - Virinae
١٤٩ جنسًا	1 49 Genera	Family - Viridae
٤ تحت أجناس	4 Subgenera	Order - Virales
٢٦٤٤ نوعًا	2644 Species	

وقد تشتمل قائمة فيروسات النبات غير المقسمة إلى عائلات على نحو ٥٠٠ خمسمائة اسم، وقد ووفق على إدراج بعض الجاميع الفيروسية السابق الموافقه عليها فى العائلات النباتية التالية فى كونجرس ١٩٩٦.

١- برومو فيريدى: Bromoviridae

وتشتمل على مجموعات (groups) برومو Bromo + كيوكومو Cucumo الأر Ilar الفامو Alfamo

الفيريون ايزومتيريك - الجينوم ثلاثى.

يتمثل بروتين الغلاف translated من تحت جينوم Sub-genomic RNA مأخوذ من ثلاث أجزاء half - 3 من سيسترون مزدوج bi-cictron لحمض RNA (c. 2k b.)

٢ - بوتى فيريدى: Potyviridae

تشتمل على مجموعات: بوتى فيروس .Poty V، بيموفيروس .Bymo V وريموفيروس RymoV وجنس أيبوموفيروس .Ipomo V، الفيريون خيطى filamentous بمقاس ٦٨٠-٩٠٠ نانومتر طول، ١١ نانومتر قطر - ينتهى حمض ssRNA فى خمس 5'Vpg، وفى poly Adenine (A) 3 جزيئات جينوم RNA، يعبر عنها بروتين apolyprotein، والتى يكون بها بروتين الغلاف النهاية C (C. Terminal) تحتوى الخلايا المصابة على محتويات داخلية سيتوبلازمية مميزة Cylindrical inclusion تتكون من بروتين الفيروس (C. 70 K)

البوتى فيروس .Poty V والريموفيروس جزئ واحد monopartite، بينما بيموفيروس ثنائى الجزئ Bipartite

٣ - كوموفيريدى: Comoviridae

وتشتمل على مجاميع كوموفيروس .Como V، ونيبوفيروس .Nepo V وفابا فيروس Faba V.

الفيريون ايزومترى Isometric والجينوم فى جزئين Bipartite والجينوم ssRNA مغلف فى بولى بروتين encoated a polyprot والجينوم له VPg & ذيل a poly A، ويحتوى الجزئ على ٨٠ طبعة Copies لبروتين واحد للغلاف أو ٦٠ طبعة، تتكون كل منها من ٢ أو ٣ أغلفة بروتينية، والذى له Mn مزدوج (> 6 K a combined Mn of < 60 K)

٤- سيكيوفيريدى: Sequiviridae

الجزيئات أيزومترية، الجينوم ssRNA فى جزيئين (Bipartite) 2 parts الجينوم RNA فى داخل أغلفه بروتينية .polyprot التى تحتوى على الغلاف البروتينى.

الجزيئات تشتمل ٦٠ نسخة، كل يتكون من ٣ أو ٤ أصناف .sp من الغلاف البروتينى.

وتتكون الأغلفة البروتينية encoded upstream من الريبلكيز Replecaise domains فى البولى بروتين، ومتبوعة بواسطة preceded نهاية N - terminal ٤٠ – ٦٠ -N .(L. protein) 40-60 k - N. terminal

٥ – تومباس فيريدى : **Tombusviridae**

وتشتمل على مجاميع تومباس فيروس Tombus وكارموفيروس .Carmo V

الجزئ أيزومترى، الجينوم جزء واحد (ssRNA) monopartit (<5kb). والغلاف البروتينى (>38 K).

توجد تكوينات مميزة فى سيتوبلازم الخلايا المصابة

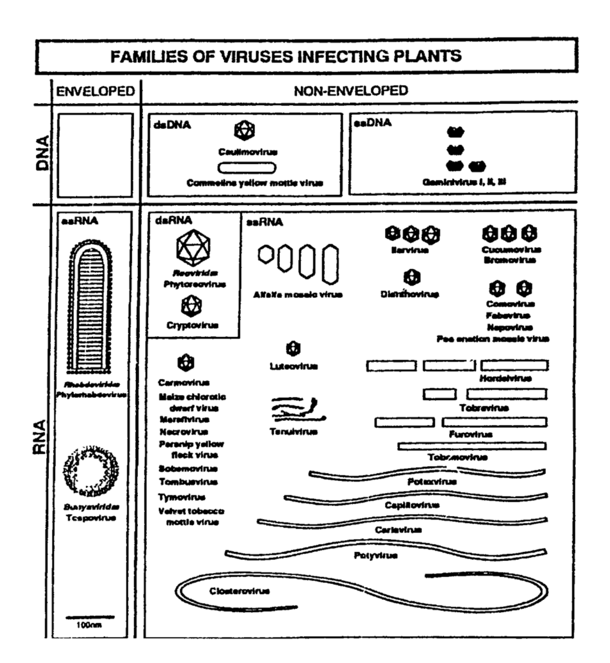
ترتيب الجينوم a 5'30 K ORF يتبع بواسطة C 90 K ORF فى العائلة نفسها.

٦ – جيمينى فيريدى : **Geminiviridae**

الجزئ مزدوج **geminate** الجينوم **ssDNA** يتكون الجينوم من :

جزئ واحد	monopartite	ويشمل قسم	Mono & Inter genera
جزئ مزدوج	bipartite	ويشمل قسم	Bigen
والقسم الأول	Mono & Inter 9	ينتقل بواسطة نطاط الورق	Leaf hopper
والقسم الثانى	Bigen	ينتقل بواسطة الذبابة البيضاء	White fly
ويصيب قسم	Mono	النباتات ذوات الفلقة الواحدة أساساً	Monocotolydon
ويصيب قسم	Inter	وتسمى Bi ذوات الفلقتين	Dicotolydon

تنقسم العائله إلى ثلاث تحت قسم أ، ب، جـ A, B, C شكل (٤ – ٢).



شكل (٤ – ٢) يمثل مجاميع وعائلات فيروسات النبات

تحت قسم أ، جـ يحتوى على جينوم من نوع ssDNA يحتوى على ٢,٦٨٧ –٢,٧٤٩، ٢,٩٩٣ نيوكليوتيد على التوالى، وينتقل بواسطة نطاط الورق – يمثل تحت قسم أ فيروس تخطيط الذرة .Maize streak V – ويصيب تحت قسم أ نباتات ذوات الفلقة الواحدة فقط

monocot.، ويمثل تحت قسم جـ C فيروس تجعد قمة البنجر Beet curly top V.، ويصيب نباتات ذو الفلقتين فقط dicot.، ويمثل تحت قسم ب B فيروس موزيك الكسافا Cassava mos. V. الأفريقى، الجينوم من جزئين ٢,٥٨٨ – ٢,٧٧٩، ٢,٥٠٨ إلى ٢,٧٢٤ نيوكليوتيد ينتقل بواسطة الذبابة البيضاء White fly، ويصيب نباتات ذوات الفلقتين فقط Dicot.

جزيئات فيروسات تحت الأقسام يكون شكلها مزدوجًا geminate بمقاس ١٨X ٢٠ نانومتر، تتكون من جزئين غير كاملين إيكوزاهيدرا icosahedra لها سيمترية T-1 .

يشتمل كل على ٢٢ كابسومير، تتركب من تحت وحدات ذات وزن جزيئى ٢٨–٣٤ X ١٠ ^{٣}، ويعتقد أن التضاعف يتم فى النواة حيث يتجمع الجزيئات فى تكتلات كبيرة والعائلة لها مجال عوائلى ضيق (قليل) .

الجزيئات توجد أساسًا فى اللحاء وأحيانًا فى بعض خلايا أخرى، بعضها يمكن أن ينتقل ميكانيكيًا . تنقل نطاطات الورق فيروسات تحت قسم أ، جـ بينما تنقل الذبابة البيضاء فيروسات تحت قسم ب فى حالة باقية Persistant .

ملخص الفروق بين مجاميع فصيلة جيمنى

Gemini Virus Groups

الفيروس Virus	العائل HOST	الناقل Vector	تركيب الجينوم Genom Comp.
تحت المجموعة : ١ Maize Streak Virus (MSV) فيروس تخطيط الأذره	ذات الفلقة الواحدة Monocot.	نطاط الورق Leafhopper.	واحد ssDNA Single Partite
تحت المجموعة : ٢ Beet Curly top V. (BCTV) فيروس تجعد قمة البنجر	ثنائية الفلقات Dicot	نطاط الورق Leafhopper.	واحد ssDNA Single Partite
تحت المجموعة : ٣ Bean Golden mosaic V. (BGMV) فيروس الموزيك الذهبى فى الفاصوليا	ثنائية الفلقات Dicot	الذبابة البيضاء White fly.	جزيئيين ssDNA Dipartite

يشمل تحت المجموعة ٢ بعض خواص من تحت المجموعة ١، ٣

كل فيروسات المجموعة جيمني لها تتابع جينوم

هذا بجانب العائلات الحيوانية التالية، والتى تشتمل على فيروسات نبات:

١ - بونيا فيريدى: Bunya viridae (ssRNA)

وتشتمل على Tospo V. تسبوفيروس / نبات - Riftvalleyv. حمى الوادى المتصدع حيوان Bunya V. بونيا فيروس / حشرات وفقاريات.

Hanta V. هانتا فيروس / فقاريات

Nairo V. نيروفيروس / فقاريات / حشرات

Plebo V. بليبو فيروس / فقاريات / حشرات

٢ - ريوفيريدى : Reoviridae (ds RNA)

وتشتمل Phytoreovirus فيتو ريوفيروس؛ أى التى تصيب النبات على :

Fiji V. فيجى ريوفيروس تصيب النبات ونطاطات النبات .

Oryza V. اوريزا ريوفيروس نصيب النبات ونطاطات النبات .

Orthoreo V. أورثوريوفيروس تصيب النبات الفقاريات .

Orbi V. أوربى ريو فيروس تصيب النبات والفقاريات والحشرات .

الصفات الأساسية :

الفيريونات لها كابسيد أيزومترية ذات سيمترية مكعبة icosahedral بقطر ٦٠ - ٨٠ نانومتر، عارية عادة ولكن يوجد أغلفة كاذبة يحتمل أنها من أصل العائل - لها كابسيد ذات طبقتين، مقاوم للمذيبات الدهنية، يحتوى الفيريون على حمض النواة ريبو مستقل وحمض نواه ريبوبوليميريز Polymerase - يحتوى الجينوم على خيط مزدوج من حمض النواة ريبو فى ١٠ - ١٢ قطعة مجمل الوزن الجزيئى ١٠ - ١٦ X ١٠^{٦}، ويكون الكل داخل كابسيد واحد .

يتكاثر الفيروس داخل السيتوبلازم مكوناً محتويات، تحتوى فى بعض الأحوال على جزيئات فيروسية فى ترتيبات بلورية .

كما أمكن تقسيم الفيروسات التى تتبع العائلة إلى :

تحت مجموعة أ :

١ - فيروس تقزم الأرز : Rice Dwarf V.

٢ – فيروس التدرن الجرحى .Wound tumer V

تحت مجموعة ب:

١ – فيروس التقزم الخشن فى الذرة .Maize rough dwarf V.

٢ – فيروس التخطيط الأسود والتقزم فى الإرز .Rice black streak dwarf V.

٣ – فيروس مرض فيجى قصب السكر .Sugarcane Fiji dis V.

٣ - بارتيتى فيريدى: Partitiviridae (ds RNA)

قد تكون هذه الفيروسات ثنائية أو ثلاثية الجينوم (dsRNA) داخل جزيئات أيزومترية قطرها ٣٠ نانومتر (تحت مجموعة A أ) أو حوالى ٣٨ نانومتر (تحت مجموعة B ب) – وتوجد بتركيزات منخفضة فى السيتوبلازم للنباتات، ولا تظهر أعراض عند حدوث العدوى. المجال العوائلى ضيق.

الانتقال خلال البذور ويتم عن طريق حبوب اللقاح والمبيض Ovule، ولا تنتقل عن طريق المن ولا بالتطعيم ولم يعرف ناقلات بيولوجية – الفيروسات قيل إنها غير قادرة على الانتشار من خلية إلى أخرى، واحتمال أن يحدث لها تضاعف فقط أثناء تكاثر الخلية.

تحت المجموعة الأولى أ : Subgroup A

فيروس كريتيك البرسيم الأبيض .White Clover Cryptic V

الحمض النووى dsRNA مستقيم ذى وزن جزيئى ١,٢ – ٠,٩٧ X $١٠^{٦}$ جزيئات ايزومترية ٣٠ نانومتر.

فيروس كريبتيك البنجر ١ Beet Cryptic V. 1

فيروس كريبتيك البنجر ٢ Beet Cryptic V. 2

تحت المجموعة الثانية ب: Subgroup B

فيرس البرسيم الأبيض ٢ White Clover Cryptic V. 2

جزيئان من dsRNA وزن جزيئى ١,٤٩ – ١,٣٨ X ١٠^٦

جزيئات أيزومترية قطرها ٣٨ نانومتر.

فيروس كريبتيك البرسيم الأحمر ٢ Red Clover Cryptic V. 2

وتشتمل على Alphacrypto V. الفاكريبتوفيروس.

Betacrypto V. بيتا كريبتو فيروس.

Partiti V. بارتيتى فيروس يصيب الفطر.

Chryso V. كريزوفيروس يصيب الفطر.

٤ – رابد وفيريدى: Rhabdoviridae (ssRNA)

وتشتمل Phytorhabdo V. فيتورابدو فيروس – تصيب النبات.

وتنقسم إلى Cytorhabdo V. سيتورابدو فيروس.

Nucleorhabdo V. نيوكليورابدو فيروس.

الصفات الأساسية للفصيلة:

الفيريونات ذات شكل رصاصى Bullet shape (مستطيلة بنهاية واحدة مستديرة والآخرة مبططة flattend) أو عصوى Bacilliform بمقاس ١٣٠–٣٠٠ نانومتر طول ٧٠ نانومتر عرض بغلاف ليبوبروتين يحتوى على جزيئات Peplames فيروسية الغلاف، ويحتوى الغشاء البروتينى على خمس بروتينات أساسية تضم حمض النواة للفيريون وآخر بوليميريس.

الجينوم جزئ واحد من حمض النواة ريبو المفرد بوزن جزيئى ٣,٥–٤,٦ X ١٠^٦. أفراد بعض الأجناس يتكاثر داخل مفصليات الأرجل، مثل الفقاريات أو النباتات الراقية وبعضها يتكاثر داخل الحشرات.

جنس رابدو فيروس النبات.

وأمكن تقسيم فيروسات الرابدو والتي تصيب النباتات تبعًا لنواقلها كالآتي:

١ – فيروسات تنتقل بواسطة المن Aphid tran mission

اصفرار الخس المنقط	- Lettuce necrotic yellows V.
فيروس بروكلى	- Broccoli V.
فيروس التبقع الأصفر للجعضيض	- Sonchus yellow mottle V.
فيروس اصفرار العرق	- Sowthislle yellow vein V.
فيروس تجعد الفراولة	- Strawberry crincle V.
فيروس تجعد الراسبرى	- Raspberry crincle V.
فيروس الزوائد فى البرسيم	- Lucerne enation V.

٢ – فيروسات تنتقل بواسطة نطاط الورق Leafhopper trans V.

فيروس اصفرار وتقزم البطاطس	- Potato yellow dwarf V.
فيروس موزيك الأذرة	- Maize mosaic V.
فيروس التخطيط فى القمح الأمريكى	- American wheat striate mos. V.
فيروس اصفرار الأرز	- Rice transitory yellowing V.
فيروس موزايك الحبوب الشمالية	- Northern cereal mos. V.
فيروس تخطيط الشعير	- Barley yellow striate mos. V.
فيروس القمح الشتوى الروسى	- (Russian) Winter wheat mos. V.
فيروس التخطيط	- Digitaria striate V.
فيروس التخطيط فى الشوفان	- Oat striate V.
فيروس التبقع الملون فى الحبوب	- Cereal chlorotic mottle V.

- Wheat chlorotic streak V. فيروس التخطيط فى القمح

- Babone disease V. فيروس البابون

٣ – فيروسات تنتقل بواسطة نواقل غير معروفة Viruses with no known vector

- Eggplant mottle dwarf V. فيروس التقزم والتبقع فى الباذنجان

- Gompherena V. فيروس المدنة

- Soncus V. فيروس سونكس

- Cynara V. فيروس السيناريا

وقد اشتملت العائلات (الفصائل) الفيروسية على المجاميع التالية:

(ملخص العائلات الفيروسية، وما تشمله من مجاميع فيروسية):

١ – بروموفيريدى: Bromoviridae

Alfamo V. gr. Cucumo V. gr. Bromo V. gr. Ilar V. gr.

مجموعة الآر – مجموعة برومو – مجموعة كيوكومو – مجموعة الفامو

٢ – بوتى فيريدى: Potyviridae

Poty V. gr. - Bymo V. gr. - Rymo V. gr.

مجموعة ريمو – مجموعة بايمو – مجموعة بوتى – مجموعة أيبومو

٣ – كوموفيريدى: Comoviridae

مجموعة فابا – مجموعة نيبو – مجموعة كومو. Como V. gr. - Nepov. gr. - Faba V. gr.

٤ – سيكوى فيريدى: Sequiviridae

٥ – تومباس فيريدى: Tombusviridae

Tombus V. gr. - Carmo V. gr. مجموعة كارمو – مجموعة تومباس

٦ – جيمنى فيريدى : **Geminiviridae**

مجموعة جيمنى — Gemni V. gr.

٧ – بارتيتى فيريدى : **Partitiviridae**

مجموعة كريبتوفيروس — Cryptovirus group

٨ – بونى فيريدى : **Bunyviridae ssRNA**

مجموعة توسبو – مجموعة بونيا — Tospo V. gr. - Bunya V. gr.

٩ – أما المجاميع التالية فلم تقسم بعد إلى عائلات (فصائل) :

مجاميع فيروسات النبات بناء على الكريبتوجرام، والتى لم تشملها العائلات.

1. Caulimovirus (Cauliflower mosaic virus group)

   [D/2: 4/16: S/S: S/VE/AP]

2. Luteovirus (Barley yellow dwarf virus group)

   [R/1: 2/*: S/S: S/VE/AP]

3. Tymovirus (Turnip yellow mosaic virus group)

   [R/1: 1.9-2.3/36: S/S: S/VE, CL]

4. Carlavirus (Carnation latent virus group)

   R/1: 1.1; 0.8; 0.7 and 0.3: U/U: S/C, VE/AP]

5. Potexvirus (Potato virus x group)

   [R/1: 2.1/6: E/E: S/O]

6. Tobamovirus (Tobacco mosaic virus group)

   [R/1: 2/5: E/E: A,S/O, C,VE/ (FU)]

7. Tobravirus (Tobacco rattle virus group)

   [R/1: 2.3 and (0.6-1.3): R/R: S/C, VE/NE]

8. Closterovirus (Beet - yellows virus group)

[R/1: 2.3-4.3/5-6: E/E: S/VE/AP]

9. Hordeivirus (Barley stripe mosaic virus group)

[R/1: 1.4; 1.2 and 1.1: E/E: S/C,*]

10. Pea enation mosaic virus group

[R/1: 1/7 and 1.4: S/S: SVE/AP]

11. Tobacco necrosis virus group

[R/1: 1.5/19: S/S: S/VE/FU]

12. Alfalfa mosaic virus group

[R/1: 1.1; 0.8; 0.7 and 0.3; U/U: S/C, VE/AP]

13. Furo virus group [Soil borne wheat mosaic virus]

[R/1: 2.28 - (0.86-1.23)/ 5:E/E: S/F]

14. Dianthovirus group (Dianthus ringspot virus group)

[R/1: 1.5-0.5*: S/S: S/O]

15. Tenuvirus group (Rice stripe virus group)

16. Marapivirus group (Maize rayadofino virus group)

[R/1: */*: */*: */*]

17. Capillovirus group (Potato virus T group)

[R/ 1: 2.5. S: F/ E: S/O]

18. Parsinip yellows fleck virus group

[R/1: 3/42: S/S: S/Ap]

19. Badnavirus group (Commelina yellow mottle virus)

[D/2:

20. Viroid virus group (Potato spindle tuber viroid)

مجاميع فيروسات النبات : Plant Virus Groups

١ – مجموعة كارلا فيروس : Carla virus: (Carnation latent virus group) R/1/5: E/E: S/AP

الفيروس الممثل للمجموعة فيروس القرنفل الكامن Carnation Latent virus

الصفات الأساسية:

حمض ريبونيوكليك خيط مفرد مطاطًا قليلاً، عصوى. سيمترية حلزونية بقطع pitch ٣,٤ نانومتر، الفيريون طوله ٦٢٠–٦٩٠ نانومتر، الحرارة المثبطة ٥٥–٧٠م – البقاء حافظًا لتأثيره المعدى بعض أيام قليلة، التركيز فى العصير ٢٠–١٠ ملليجرام / لتر.

تظهر مظاهر إصابة قليلة أو متخفية، مجاله العوائلى ضيق، ربما يكون له ناقل حشرى من المن، الفيروس باق أقل من ٢ ساعة فى المن المغذى، ينتقل ميكانيكيًا، العلاقة السيرولوجية بين أفراد القسم بعيدة.

فيروسات أخرى بالمجموعة:

١ – موزايك الصبار رقم ٢ .	Cactus Virus 2
٢ – فيروس الكريزانتيمم ب .	Chrysanthemum V. B
٣ – فيروس باسيفلورا.	Passiflora Latent V.
٤ – فيروس التخطيط فى البسلة.	Pea Streak V.
٥ – فيروس م البطاطس.	Potato M. Virus
٦ – فيروس س البطاطس.	Potato S. Virus
٧ – فيروس موزايك عرق البرسيم الأحمر.	Red Clover vein Mos. V.

٢ – مجموعة كوليموفيروس: Caulimo virus group

مجموعة فيروس موزايك القرنبيط Cauliflower mosaic virus group

الفيروس الممثل للمجموعة: فيروس موزايك القرنبيط Cauliflower mosaic virus

D/2: 5/15: S/S: S/Ap

سلالة الكرنب س Cabbage Strain S

الصفات الأساسية للمجموعة

حمض النواة ديزوكسى، مزدوج، وزنه الجزيئى حوالى ٥X١٠^٦، ٤٣٪ – جزيئات كروية isometric بقطر حوالى ٥٠ نانوميتر وحوالى ٢٢٠ س (220s)، لا توجد جزيئات أخرى ac-cessory، درجة الحرارة المؤثرة ٧٥–٨٠م، البقاء فى العصير أيام قليلة، التركيز فى العصير ١٠–١٠٠ ملليجرام/ لتر، مظاهر الإصابة الموزايك والتبقع. مجال عوائلى ضيق، ينتقل بالمن، يظل بالمن بعض ساعات بعد التغذية، وينتقل أيضًا ميكانيكيًا، توجد علاقة سيرولوجية بين أفراد المجموعة.

فيروسات تتبع المجموعة:

فيروس موزايك الداليا Dahlia mosaic virus (D) /*: */*: S/S: S/Ap

٣ – مجموعة بوتيكس فيروس Potex virus Gr. CR/1: */6: E/E: S/O,

(Potato virus X)

مجموعة فيروس موزيك X البطاطس (Potato virus X)

الفيروس الممثل للمجموعة هو – فيروس X البطاطس, R/1: */6: E/E: S/O

الصفات المميزة للمجموعة:

يحتوى حوالى ٦٪ حمض النواه ريبوز، قضبان مرنة، سيمترية حلزونية بقطع pitch ٣,٤ نانومتر، الجزيئات المعدية تحتوى حوالى ١١٨ س 118_S وحوالى ٤٨٠–٥٨٠ نانومتر طول، الحرارة المؤثرة ٦٥–٧٥°م، البقاء فى العصير، تركيزه فى العصير ٥٠٠ ملليجرام/ لتر، مظاهر الإصابة غالبًا الموزايك، التبقع والبقع الحلقية، المجال العوائلى محدود بقدر ما، ينتشر ميكانيكيًا، علاقة سيرولوجية بعيدة بين أفراد المجموعة.

فيروسات أخرى تتبع المجموعة:

١ - فيروس X الصبار.	Cactus X. Virus
٢ - فيروس الموزايك الأصفر فى البرسيم.	Clover yellow mos. V.
٣ - فيروس النقطة الحلقية فى الهيدرانجا.	Hydrangea rinqspot V.
٤ - فيروس موزايك البرسيم الأبيض.	Whit clover mos. V.

فيروسات يحتمل أنها ضمن المجموعة:

١ - فيروس تقزم والتفاف الخرشوف.	Artichoke early dwardV.
٢ - فيروس الموزايك العادى فى الكاسافا.	Cassava common mos V.
٣ - فيروس سيمبيديوم موزايك	Cymbidium mosaic virus
٤ - فيروس موزايك النرجس.	Narcissus mos. V.
٥ - فيروس موزايك الباباظ.	Papaya mos. V.
٦ - فيروس اكيوبا موزايك البطاطس.	Potato aucuba mos. V.

٤ - مجموعة توبامو فيروس: Tobamo virus

(Tobacco mosaic virus)

الفيروس ممثل المجموعة هو فيروس موزايك الدخان R/1: 2/5: E/E: S/O

الصفات الأساسية للمجموعة:

تحتوى على حوالى ٥٪ حمض النواة ريبوز مفرد، وزنه الجزيئى حوالى ٢×١٠^{٦} جزيئًا مستقيمة أسطوانة حوالى ١٩٠ 190_S، سيمترية حلزونية بأجزاء (قطع) حوالى ٣٠٠ نانوميتر، درجة الحرارة المؤثرة أكبر من ٩٠°م، مدة البقاء محتفظًا بحيويته فى العصير هى سنين، التركيز فى العصير غالبًا أكبر من ١ ملليجرام/ لترًا، مظاهر الإصابة هى الموزايك

والتبقع، ينتشر ميكانيكيًا، النواقل الحشرية غير معروفة، توجد علاقة سيرولوجية بين أفراد المجموعة.

فيروسات أخرى تنتمي للمجموعة:

١ - فيروس التبقع الأخضر فى الموزايك فى الخيار.	Cucumber green motlle V.
٢ - فيروس النقطة الحلقية فى أدونتوجلوسوم.	Odontoglossom ingspot V.
٣ - فيروس موزايك فى الرايب جراس.	Ribgrass mos, V.
٤ - فيروس الأبانتيا.	Sammons opumtia V.
٥ - فيروس السن هيب.	Sun hip mos V.
٦ - فيروس موزايك الطماطم.	Tomato mos. V.

٥ - مجموعة توبرا فيروس Tobra virus

الفيروس ممثل المجموعة هو: فيروس قرقعة الدخان (Tobacco rattle virus)

$$R/1: \frac{2.3}{5} + \frac{0.9}{5} \quad : E/E: S/C, Ve/Ne$$

الصفات الأساسية للمجموعة:

الفيريونات مستقيمة: جزيئات أنبوبية مستقيمة، ذات سيمترية حلزونية، الوزن الجزيئى للوحدات subunits ٢٤,٠٠٠، يوجد شكلان من الجزيئات (أ) طولها ١٨٠-٢١٠ نانوميتر، معدية حوالى ٣٠٠ (300s) تحتوى حمض ريبونيوكلييك، وزنه الجزيئى ٢,٤ X ٦١٠، (ب) وحدات نيوكليوبروتين بطول طبقًا للسلالة والبروتين المغلف وزنه الجزيئى ٢٠,٠٠٠.

درجة الحرارة المؤثرة ٧٠-٨٠°م، البقاء فى العصير نشطًا لبضعة أشهر، التركيز فى العصير عادة ٢٠-١٠٠ ملليجرام/ لتر. مظاهر الإصابة غالبًا نيكروزيس، لها مجال عوائلى واسع.

الانتقال ميكانيكى كذلك بالنيماتودا Paratrichodorus and Trichodorus sp.

باق لأسابيع فى النيماتودا. القرابة السيرولوجية بين أفراد المجموعة متباعدة.

فيروسات أخرى:

فيروس التلون البنى المبكر فى البسله Pea early-browning virus

٦ - مجموعة تيموفيروس: Tymovirusgr

R/1: 2/36: S/S: S/Cl

مجموعة فيروس الموزيك الأصفر فى اللفت (Turnip yellow mosaic virus)

الصفات الأساسية للمجموعة:

الفيريونات جزيئات متناظرة بقطر ٣٠ نانوميتر وحوالى ١١٠ (110s) تحت الوحدات البروتينية ١٨٠ فى عناقيد خماسية، سداسية، الوزن الجزيئى لتحت الوحدة حوالى ٢٠,٠٠٠، الجزيئات المساعدة ٥٠ (50s) عبارة عن كبسولات بروتينية فارغة، دون حمض النواة ريبو.

الجينوم جزىء واحد من حمض ريبوكليبك مفرد بوزن جزيئى حوالى ٢X ١٠^٦، ومحتوى عالٍ من حمض cytidylic (حوالى ٤٠٪).

الحرارة المؤثرة عادة ٧٠-٩٠م، البقاء فى العصير نشطًا بضع أسابيع قليلة، والتركيز فى العصير ٥٠-٥٠٠ ملليجرام/ لتر.

مظاهر الإصابة هى الموزايك والتبقع، المجال العوائلى ضيق، الناقل الحشرى هو الخنافس ويظل فى الخنافس عدة أيام، ينتقل أيضًا بالحقن بالعصير - توجد علاقة سيرولوجية بين أفراد المجموعة.

فيروسات تتبع المجموعة:

١ - فيروس انديان البطاطس المتأخر (الكامن) Andean potato latent virus

٢ – فيروس تبقع البلادونا	Belladonna mottle V.
٣ – فيروس الموزايك الأصفر فى الكاكاو	Cacao yellow mos. V.
٤– فيروس اصفرار عرق الكليتوريا	Clitoria yellow vein virus
٥ – فيروس التبقع الأصفر فى الدسموديوم	Desmodium yellow mottle virus
٦ – فيروس تبقع الديكامورا	Dulcamora mottle virus
٧ – فيروس موزايك الباذنجان	Eggplant mosaic V.
٨ – فيروس الارستيم المتأخر	Erysimum latent virus
٩ – فيروس الموزايك الأصفر فى الكينيدريا	Kennedya yellow mosaic virus
١٠ – فيروس موزايك الباميا	Okra mos. V.
١١ – فيروس الموزايك الأصفر فى البصل	Onions yellow mos. V.
١٢ – فيروس موزايك الفيساليس	Physalis mos. V.
١٣ – فيروس موزايك الخيار البرى	Wild cucumber mos. V.

٧ – مجموعة كلوستيرو فيروس: Clostero virus gr

R/1: 2.3-4.3/5-6: E/E: S/Vel/Ap

ممثل المجموعة – فيروس اصفرار البنجر (Beet yellows virus)

الصفات الأساسية للمجموعة:

الفيريونات عصوية مرنة جداً ذات سيمترية حلزونية بقطع ٣,٧ نانومتر. طوله يتراوح بين ٦٠٠–٢٠٠٠ نانومتر.

الجينوم عبارة عن حمض النواة ريبوز مفرد، وزنه الجزيئى ٢,٣–٤,٣ X ١٠^٦، درجة الحرارة المؤثرة ٤٥–٥٥°م وحدة البقاء فى العصير أيام قليلة، وتركيزه فى العصير ٤٠–١٠٠ ملليجرام/ لتر.

مظاهر الإصابة على الأوراق: هى الأصفرار مع نقط نيكروزيسية. المجال العوائلى متوسط دائمًا ما تتجمع الجزيئات العصوية فى كتل حزمية متقاطعة فى خلايا اللحاء. بعض الفيروسات تنتقل بالمن، وتنتقل بالحقن بالعصير بصعوبة.

لا توجد قرابة سيرولوجية بين الأفراد.

فيروسات تنتمى للمجموعة:

١ – فيروس اصفرار وتقزم البنجر Beet yellow Stunt V.

٢ – فيروس نيكروزيس القرنفل Carnation necrotic fleck virus

٣ – فيروس التدهور السريع فى الموالح Citrus Tristeza V.

٤ – فيروس نيكروزيس الفستوكا Festuca necrosis virus

٥ – فيروس اصفرار ورقة القمح Wheat yellow leaf V.

فيروسات يحتمل انتماؤها للمجموعة:

١ – فيروس الساق ذو الخندق فى التفاح Apple stem grooving V.

٢ – فيروس النقط الورقية الصفراء فى التفاح Apple Chlorotic Leafspot V.

٨ – مجموعة هوردى فيروس: Hordeivirusgr

hordei: from latin hordeums "barley"

الفيروس الممثل للمجموعة هو فيروس التخطيط فى الشعير

الصفات المميزة للمجموعة R/1: 1.4-1.2-1.1/4: E/E: S/C Barley stripe mosaic virus

الجزيئات مستقيمة أنبوبية ٢٠ – ٢٥ نانومتر قطر، ١١٠–١٦٠ نانومتر طول ذات سيمترية حلزونية بقطع طولها حوالى ٢,٥ نانومتر.

الجينوم يتكون من حمض النواة ريبوز، مفرد به أشكال عديدة على الأقل ٢ أو ٣ محتويات حمض بأوزان جزيئية، تتراوح بين حوالى ١×١٠^٦ – ١,٥ ×١٠^٦ تؤدى للإصابة.

درجة الحرارة المؤثرة ٦٣ – ٧٠م، البقاء فى العصير أيام قليلة أو أسابيع، مظاهر الإصابة الإصابة على الورقة، هى: موزايك مصفر أو مصحوب بنكروزيس. المجال العوائلى ضيق بعض الشىء.

ينتقل بعض أفراد المجموعة خلال البذور وحبوب اللقاح، بالحقن بالعصير لا يعرف ناقل حشرى، تباعد فى الخواص السيرولوجية لأفراد المجموعة.

فيروسات تتبع المجموعة:

١ – Poa semilatent virus

٢ – Luchnis ringspot V.

٩ – مجموعة ليوتى فيروس: Luteovirus gr

R/1: 2/4: S/S: Ve/Ap

مجموعة فيروس تقزم واصفرار الشعير (Barley yellow dwarf virus) gr

Luteo: From latin Luteus "Yellow" from yellowing symptoms

تسمية لوتيو مأخوذة من اللغة اللاتينى حيث قضى الاصفرار.

الصفات الأساسية للمجموعة:

الفيريونات عبارة عن جزيئات متناظرة ١١٥–١١٨ (115-118 s)، وبقطر حوالى ٢٥ نانومتر، الجينوم هو جزئ واحد من حمض النواة، ريبو مفرد بوزن جزيئى ٢,٠ ×١٠^٦.

درجة الحرارة المؤثرة ٦٥–٧٠م – التركيز فى العصير عادة أقل من ١٠٠ ملليجرام/ لتر ينتقل خلال المن، فيروس باق، للسلالات الفيروسية تخصص فى اختيار الناقل لا تنتقل بالحقن بالعصير.

بعض أفراد المجموعة له علاقة سيرولوجية.

فيروسات تتبع المجموعة:

١ - فيروس التواء ورقة الفاصوليا	Bean Leaf - roll V.
٢ - فيروس الأصفرار الخفيف فى الفاصوليا	Bean mild yellowing V.
٣ - فيروس احمرار ورقة الجزر	Carrot red leaf V.
٤ - فيروس احمرار انتوسياثين القطن	Cotton anthocyacianosis V.
٥ - فيروس احمرار ورقة الفلاريا	Filaree red Leaf V.
٦ - فيروس الكلوروسيس الخفيف فى الفياليس	Physalis mild chlorosis V.
٧ - فيروس التواء أوراق البطاطس	Potato leaf roll V.
٨ - فيروس الاصفرار الخفيف لحواف أوراق الشليك	Strawberry mild yellow edge V.
٩ - فيروس تقزم البرسيم	Subterranean clover stunt virus
١٠ - فيروس تشوه عرق الدخان	Tobacco vein distorting V.
١١ - فيروس اللفت المتأخر	Turnip latent V.
١٢ - فيروس اصفرار اللفت	Turnip yellows V.

١٠ - مجموعة فيروس الموزايك والنموات الزائدة فى البسلة

Pea enation mosaic virus group:

مجموعة من شكل واحد

الفيروس ممثل المجموعة:

فيروس الموزايك والنموات الزائدة فى البسلة   Pea enation mosaic virus

R/1: 1.7-1.4/29: S/S: S/Ve/Ap

الصفات الأساسية للمجموعة هى:

الفيريونات عبارة عن جزيئات أيزومترية بقطر ٩٠، ٢٨ نانومتر، و ١١٥ (1/5s)، وتحتاج جزيئات الشكلين للعدوى. تحت الوحدة البروتينية ذات وزن جزيئى حوالى ٢٢,٠٠٠، الجينوم الثنائى Bipartite بعمل مكمل بين شكلين من حمض النواه ريبوز بأوزان جزيئية ١,٧، ١,٤ X١٠^٦، ويوجد شكل ثالث من الحمض بوزن جزيئى ٠,٣ X ١٠^٦ مع بعض الأصناف.

الحرارة المؤثرة ٥٥–٦٠م، البقاء فى العصير أيام قليلة، التركيز فى العصير عادة ٥–٢٥ ملليجرام/ لتر.

مظاهر الإصابة التبقع والنموات الزائدة – المجال العوائلى ضيق.

ينتقل بالمن، يظل بالمن أسابيع، ينتقل بالحقن بالعصير.

١١ – مجموعة فيروس نيكروزيس الدخان Tobacco Necrosis virus group

الفيروس الممثل للمجموعة هو – فيروس نيكروزيس الدخان

(سلالة أ) Tobacco necrosis virus (Strain A)

R/1: 1.5/19: S/S: S/Ve/Fu.

الصفات الأساسية للمجموعة:

الفيريونات عبارة عن جزيئات أيزومترية بقطر حوالى ٢٨ نانومتر، وسرعة ترسيب ١١٨ س تحت الوحدات البروتينية، وزنها الجزيئى حوالى ٢٣,٠٠.

الجينوم خيط مفرد من حمض النواة ريبو بوزن جزيئى حوالى ١,٥X ١٠^٦

درجة الحرارة المؤثرة ٦٥ – ٩٥م – البقاء فى العصير حتى أشهر قليلة – المجال العوائلى متسع، ينقله فطر أولبيديوم Olpidium، ويحتمل بقاءه فى الجراثيم Zoospore الزيجية لبضع ساعات ينتقل بالحقن بالعصير.

توجد علاقة سيرولوجية بين افراد المجموعة.

فيروسات أخرى تتبع المجموعة:

١ – فيروس نيكروزيس الدخان (سلالة د) Tabacco necrosis V. (str d.)

فيروسات يحتمل أنها تتبع المجموعة:

١ – فيروسات نيكروزيس الخيار Cucumber necrosis V.

١٢ – مجموعة فيروس موزيك البرسيم (الفالفا)

Alfalfa mosaic virus group;

R/1: 1.1-0.8-0.7- 0-3/16: U/U: S/C, Ve/ Ap.

الفيروس الذى يمثل المجموعة هو:

فيروس موزيك الألفالفا Alfalfa mosaic virus

الصفات الأساسية للمجموعة:

الجزيئات على الأقل أربعة أشكال، ثلاث عصوية baciliform بأبعاد ١٨X٥٨، ١٨X٤٨، ١٨X٣٦ نانومتر، وواحد دائرى بقطر ١٨ نانومتر، سرعة الترسيب ٩٩، ٨٩، ٧٣، ٦٨ على التوالى. الكل يحتوى على خيط مفرد من حمض نواة ريبوز. وغلاف واحد بروتين ٢٤٥٠٠ دالتون.

الجينوم المجزأ بأحد من الثلاث أشكال الكبيرة أو الأربعة، تحتاج إلى حمض نواة ريبوز، درجة الحرارة المؤثرة ٦٠–٧٠م – البقاء فى العصير أيام قليلة – التركيز فى العصير ٢٠–٥٠٠ مجم / لتر – مظاهر الإصابة التبقع والموزايك والنقطة الحلقية – ذو مجال عوائلى متسع.

ينتقل بالمن. يظل بالمن أقل من ساعتين – ينتقل بالحقن بالعصير – ينتقل خلال البذور.

– مجموعة فيروس اصفرار اللفت Parsinip yellow fleck V. gr.

الفيروس الممثل للمجموعة Parsnip yellow fleck V.

جزئ واحد من الحمض ssRNA موجب ذو وزن جزيئى ٣٫٥ X ١٠^{٦} ثلاثة أنواع رئيسية من البـروتين، ذات وزن جـزيئى ٢٢٫٥ – ٢٦ – ٣١ X ١٠$^{-٣}$ جزيئات أيزومترية قطرها ٣٠ نانومتر.

توجد محتويات داخلية فى الخلايا المصابة ملاصقة للنواة، تحتوى على تركيبات وعائية وأنابيب مستقيمة قطرها ٣٠ نانومتر.

المجال العـوائلى ضيـق يسـبب تبـقـعـاً ومـوزايك، وفى بعض الأنواع ذبولاً ومـوتاً، ينتـقل بالحقن الميكانيكى – بالمن كنصف باق بالاشتراك مع فيروس مساعد Helper.

مجموعة كابيللو .Capillevirus gr:

الفيروس الممثل للمجموعة .Potate V. T الحمض ssRNA جزئ واحد مستقيم، وزنه الجـزيئى ٢٫٥ X ١٠^{٦} بنسـبة ٥٪، جزيئـات خيـطية مرنة أبعـادها ١٢ X ٦٤٠ نانومتـر ذات سيمترية حلزونية المجال العوائلى محدود (نفق ساق التفاح) .Apple stem grooving V الناقل غير معروف – تنتقل عن طريق التطعيم وبالحقن الميكانيكى بالعصير.

مجموعة مارافى .Marafi V. gr:

وكان اسم الفيروس الممثل للمجموعة .Maize raydo fino V.

الفيروس كروى ss - RNA.

مجموعة تينيو فيروس .Tenu V. gr.

وكان اسمها .rice stripe V. gr ويشـمل Rice hoja blanka الفيـروس خيطى متفرع ssRNA.

– مجموعة فيورو فيروس .Furo V. gr:

ssRNA يحتوى على جزيئين (ثنائية الجينوم) تنتقل بالفطريات، وكانت سابقاً ضمن .Tobomo. V. gr، ومنها:

- Soil born wheat V.

Peanut clump V.

Potato mop top V.

شكلها عصوى Rod shope تشبه .Tobamo V.

مجموعة بادنا فيروس: Badma V. gr.

وتشتمل على فيروسين:

Rice Tungro Bacilliform V.

Rice Tungro Sphericol V.

الكروى بقطر حوالى ٣٠ (والأنيوس بمقياس ١٦٠ – ٢٢٠ X ٣٠ – ٣٥ نانومتر كان مع مجموعة Commelina yellow mottle V. gr.، والذى اشتق منه اسم بادنا) حمض نووى ssRNA.

مجموعة: Diantho V. gr.

تشتمل هذه المجموعة على ثلاثة أعضاء: العضو الأساسى Carnation Ring spot V. فيرو البقع الحلقية فى القرنفل (CRSV)، وفيروس Sweet Clover necrotic m. V. نيكروزيس وموزيك البرسيم الحلو (SCNMV)، وفيروس Red clover necrotic m. V. نيكروزيس وموزايك البرسيم الأحمر (RCNMV) الثلاثة فيروسات ثابتة وبتركيز عالٍ فى النبات المصاب ١٥٠ – ٣٠٠ ملليجرام/كيلو جرام نسيج مصاب.

الباب الخامس

تنقية فيروسات النبات وخواصها الطبيعية والكيميائية

PURIFICATION OF PLANT VIRUSES & ITS PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

تنقية فيروسات النبات وخواصها الطبيعية والكيميائية

PURIFICATION OF PLANT VIRUSES & ITS PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

لدراسة التركيب وغيره من الصفات الأساسية للفيرس، فمن الضرورى الحصول عليه فى صورة نقية مع المحافظة على قدرته على العدوى. وتتفاوت الفيروسات النباتية تفاوتًا كبيرًا فيما بينها فى حدود ١٠٫٠٠٠ ضعف فى كمية الفيروس، التى يمكن استخلاصها من الأنسجة المصابة (من حوالى ٤ر إلى ٤٠٠٠ ميكروجرام/جرام وزن طازج) كما تتفاوت الفيروسات فيما بينها تفاوتًا كبيرًا من حيث الثبات Stability أو تحمل عديد من العوامل الطبيعية والكيماوية والإنزيمية، التى يمكن أن يتعرض لها الفيرس خلال عملية الفصل والتخزين، ومن أجل ذلك لا توجد قواعد ثابتة لعملية الفصل بالنسبة لكل الفيروسات، حيث إن الطريقة التى تؤدى إلى نتائج جيدة بالنسبة لفيرس ما يمكن أن تفشل تمامًا مع فيرس آخر قد يكون متشابهًا مع الأول.

الفصل الأول

تنقيـة الفيـروس

PURIFICATION OF VIRUSES

المقصود بالتنقية أنها عملية ينتج عنها زيادة في نشاط التحضيرات الفيروسية وهذا يترجم إلى زيادة الوحدات القادرة على الإصابة لوحدة الوزن للمادة (عادة البروتين أو النيتروجين).

ومن المعروف أنه يتكون داخل الخلايا المصابة مواد غريبة غير الجزيئات الفيروسية أو الحاملة لصفة العدوى، مثل:

١ - أشكال خيطية (Filamentous) وأشكال غير كاملة كما في فيروس الأنفلونزا، حيث يظهر بها أن جزيئات الفيروس غير متماثلة Heterogenous.

٢ - جزيئات غير معدية، ولكن لها صفة الأنتجين الفيروسي Antigenic specificity.

٣ - جزيئات صغيرة تسمى أنتجينًا ذائبًا Soluble antigen لا ترسب تحت ظروف ترسيب الفيروس. وقد عرف أنها توجد في كثير من فيروس الحيوان.

٤ - جزيئات غير معدية من حجم الفيروس نفسه، كالتي وجدت في حالة الإصابة بفيروس موزايك اللفت Turnip yellow m.v.

والمحتويات السابقة التي توجد في العائل المصاب وتحتوي على بعض خواص الفيروس (صفة الانتجين) ليست لها القدرة على العدوى، وتكون ذات وضع مختلف. وتنفصل مثل هذه المواد بواسطة الطرق الطبيعية أو الكيميائية.

والتحضير النقي في عرف الكيمياء الطبيعية عبارة عن تحضير يحتوي على مكون واحد متجانس، ويكون كل جزء فيه أو كل وحدة منه مكونة من جزيئات موحدة التركيب الكيمياوي، إلا أن مثل هذا التعريف لا يجد قبولاً عند رجال البيولوجي خاصة رجال

الوراثة إذ إنهم يعتقدون أن التحضير النقى، هو الذى لا يمكن فيه فصل صفة العدوى عن الجزيئات الموجودة، والذى لا يتميز فيه وجود المحتويات غير الفيروسية، ولكن مثل هذا التعريف يترك مجالاً للاختلافات الكيميائية الطبيعية خاصة فى مورفولوجى الفيروسات الكبيرة المعقدة وخاصة الجزيئات غير المميزة والطفرات، التى توجد بكل تأكيد فى أعداد كبيرة.

وعلى العموم فيمكن الخروج من هذا الجدل وتعريف التنقية بأنها تحضير للمادة، التى تحمل النشاط الفيروسى فى شكل خالص بقدر الإمكان من المادة التى لا تحدث إصابة.

لقد بدأ العمل الأول فى التنقية Original work على فيروس النبات، حيث إنه يمكن الحصول عليه بكميات كبيرة، وللسهولة النسبية فى فصله عن محتويات النبات. ويعتبر فيروس موزيك الدخان مثلاً لذلك، حيث استعمل بكثرة لزيادة الكمية التى يمكن الحصول عليها، وهى ١٠٪ من الوزن الجاف للنبات المصاب، ويمكن تنقيته دون انخفاض ملحوظ فى صفة العدوى، كما أنه يمكن الحصول على محلول متجانس منه.

ولقد بدأت محاولات عزل وتنقية فيروس موزيك الدخان من عصير النباتات بواسطة Mulvania, 1926, Vinson and Pirie, 1928, 1931، والذين اكتشفوا أن فيروس موزيك الدخان يمكن ترسيبه بمرسبات البروتين، دون أن يفقد قدرته على إحداث العدوى.

وقد أثار هذا الاكتشاف قليلاً من الاهتمام إلى أن جاء Stanley, 1935 وعزل فيروس موزيك الدخان TMV على هيئة بروتين متبلور. ومن هنا بدأ وضع طرق أخرى يمكن بواسطتها تنقية فيروس موزيك الدخان وعديد من الفيروسات الأخرى، ومنذ هذا الوقت احتلت دراسة التحضيرات النقية مكانة كبيرة فى أبحاث الفيروس. وتعطى هذه الطرق تحضيرات قادرة على العدوى لبعض الفيروسات.

ويمكن الوصول إلى التنقية اللازمة باتباع طرق تفصل إما المواد الغريبة وإما الفيروس من المخلوط، أو تفصل المخلوط إلى محتويات مختلفة Various fractions، والذى منها واحد أو أكثر يحتوى الفيروس.

وعمليًا فلا توجد عملية واحدة يمكن بواسطتها فصل الفيروس كلية عن المواد الأخرى من المخلوط البيولوجي.

ويمكن تلخيص عمليات التنقية بالنسبة للفيروسات المختلفة في النقاط التالية:

١ - استخلاص المحلول الخام (العصير) المحتوى على الفيروس من نسيج العائل Extraction.

٢ - ترويق العصير Clarification.

٣ - الحصول على الفيروس Purification.

إن تكرار بعض العمليات السابقة عمل مرغوب، حيث إن المواد الغريبة يصعب فصلها عن الفيروس بإجراء العملية مرة واحدة، فاستعمال أكثر من عملية يعطى فرصة أفضل للتخلص منها.

وهناك قواعد مهمة يجب ملاحظتها عند تنقية بروتين ما، وأهمها:

١ - معرفة درجة ثبات البروتين (الفيروس) Stability لدرجات حرارة مختلفة ولدرجات pH مختلفة.

٢ - في أى المذيبات (غير الماء) يمكن أن يترسب البروتين دون تغيير في خواصه.

وعلى ضوء هاتين النقطتين سنناقش باختصار العمليات المختلفة Procedures لتنقية بروتين الفيروس.

أولاً: استخلاص المحلول الخام (العصير): Sap Extraction

تختلف وسائل استخلاص العصير الخام باختلاف طبيعة الإصابة الفيروسية والخلايا التى يوجد بها، وما إذا كان الفيروس موجوداً داخل خلايا فردية طليقة، مثل الملتقمات في البكتريات، أو داخل خلايا سطحية في الجلد أو بشرة النبات، مثل الفيروسات التى تحدث البثرات والثآليل الجلدية في أمراض الجدرى والحصبة والحمى القلاعية، أو تلك التى تحدث أضراراً واضحة في أوراق النباتات.

أما إذا كانت الإصابة غائرة في أنسجة داخلية كأمراض التبقع والإصفرار وتجعد الأوراق

فى النباتات فإن هذا يتطلب استخراج المحلول الخام من هذه الأنسجة.

يبدأ بعمل مستخلص من خلايا الأنسجة التى تحتوى على الفيروس المطلوب. ويفضل أن تتم هذه العملية على درجة حرارة منخفضة ٢-٥°م، وفيها تكسر الخلايا بطرق عدة، منها:

١ - التجميد والإذابة Freezing & Thowing حيث توضع الأوراق المصابة على درجات حرارة منخفضة تصل إلى التجميد لعدة ساعات، تعرض بعدها للجو العادى، وبهذه العملية تتهتك جدر الخلايا ويسهل استخراج العصير.

٢ - الطحن Grinding وفيها تطحن الأنسجة فى هاون معقم.

٣ - الرج مع كتل زجاجية Shaking with glass beads.

٤ - الفرم Mincing مثل الفرم بالمفرمة Meat mincer.

٥ - الفصل بواسطة الموجات الصوتية Disintergating with Sonic waves.

ويستخرج العصير بواسطة عصر الأوراق المهروسة وتصفيتها Squeeze خلال قطعة شاش Cloth bag، وقد لوحظ أن الألياف المتبقية من عملية العصر تحتوى على فيروس قد يكون أكثر مما يحتويه العصير المستخلص، وتحتاج إلى معاملات خاصة لإطلاقه. وأبسط هذه المعاملات هى إعادة طحن الألياف مع قليل من الماء أو محلول منظم ثم عصرها.

وقد وجد Bawden and Pirie, 1944 أن مستخلص الماء لألياف النباتات المصابة بفيروس TMV, Tobbaco necrosis & Tomato bushy stunt يحتوى على فيروس أكثر من الذى يوجد فى العصير المستخلص.

وقد لا يطلق الطحن كل الفيروس المتبقى بالألياف، كما أنه قد يتلف بعضها، ولذلك وجد أنه يمكن الحصول على تركيز عالٍ من الفيروس PVX أو TNV بواسطة تحضين الألياف مع إنزيم Protease or nuclease لعدة ساعات ثم إعادة طحنها خفيفًا وعصرها.

وعمومًا فإن النسبة بين الفيروس فى العصير المستخلص والفيروس المتبقى فى الألياف كبيرة وواضحة، وتختلف من فيروس لآخر، ومن طريقة استخراج إلى أخرى.

ولم توجد اختلافات فى حجم وشكل الجزيئات الفيروسية لفيروس التقزم الشجيرى فى الطماطم المستخرج من العصير وذلك المستخرج من الألياف، ولكن وجد أن مستخلص فيروس TMV من الألياف يحتوى على جزيئات أصغر حجماً وأقل فى قدرتها على العدوى من الجزيئات الأساسية للفيروس. وكذلك الحال بالنسبة لفيروس PVX.

التغيرات التى تحدث فى الفيروس اثناء استخلاصه:

يكون الفيروس الذى يستخلص من الأنسجة الداخلية بالوسائل السابقة عرضة لحدوث بعض تغييرات فى طبيعته على النحو الآتى:

١ – قد يكون العصير المستخلص مع الفيروس من خلايا الأنسجة ذا تأثير مرسب للفيروس، مثل فيروس تجعد الأوراق وفيروس اصفرار حافة الورقة فى الشليك، إذ لا يستطاع استخلاصها من العصير؛ نظراً لاحتواء العصير على كمية من حامض التنيك تكفى لترسيب أجسام الفيروس جميعها، ويرسب معها أيضًا جميع البروتين الموجود فى العصير.

٢ – قد تحتجز بعض محتويات الخلية جزيئات الفيروس أثناء استخلاصها مثل بعض جزيئات البروتين فى المحلول الخام بعد استخلاصه كما قد يدمص أيضًا جدران مسام المرشحات أثناء ترشيحه.

٣ – قد تؤثر عملية استخلاص التحضير على الفيروس نفسه فتتفتت أجسامه.

٤ – قد تحدث تغيرات كيميائية فى الفيروس أثناء استخلاصه.

٥ – قد يشمل المستخلص جزءاً فقط من الفيروس الموجود فى النسيج.

ويكون هناك اختلاف لا نعرفه بين الجزء المستخلص والجزء الباقى فى الخلايا، اختلاف فى الطبيعة والتركيب والنشاط. وقد يفقد الفيروس المستخلص قليلاً أو كثيراً من المواد التى تلازم جسمه داخل الخلية، أو قد يختلط ببعض مشتملات الخلية نفسها.

٦ – قد يشمل المحلول الخام أجسامًا أخرى غير الفيروس ذات صلة به يكون لها صفاته السيرولوجية، ولكنها غير قادرة على العدوى.

ثانياً : ترويق العصير : Clarification

يستعمل الطرد المركزى البطئ لعصير نباتات الدخان المصابة بفيروس موزيك الدخان لإنتاج سائل رائق، حيث إن أغلب مكونات العائل تترسب. ويزيد من كفاءة عملية الترويق حفظ العصير المستخلص لعدة ساعات إما على درجة حرارة المعمل أو فى الثلاجة. كما أن تسخين العصير المستخلص على درجة ٦٠°م يجمع عديداً من مكونات العصير، ويعطى تنقية جيدة، إلا أنها قد تؤثر على حيوية بعض الفيروسات، ولذلك لا تستعمل إلا للفيروسات الثابتة ذات درجة الحرارة العالية لتعيد نشاطها.

قد تستعمل بعض المذيبات العضوية التى تؤدى إلى اختزال الدهون Lipids وتحليل المواد الغريبة البروتينية، ومن هذه المواد: مادة الفلوروكربونات Fluorocarbons، بيوتانول Butanol، كلوروفورم chloroform أو مخاليط من الاثنين الأخيرين. ولا تتأثر الفيروسات البسيطة التى تحتوى على نيوكليوبروتين ولكن يحصل تجريح disruption وتثبيط inactivation للفيروسات التى تحتوى دهون Lipids.

ثالثاً : ترسيب وتجميع الفيروس : Virus Precipitation & accumilation

إن البروتين وحمض النواة المركبين الأساسيين فى تركيب الفيروس يوجدان أيضاً فى خلايا العائل بكميات أكبر آلاف المرات عن وجودهما فى الفيروس. ولذلك فإن الطرق التى تتبع يجب أن تميز بين البروتين وحمض النواة الخاص بالفيروس ومثيلهما فى خلايا العائل.

وتعطى درجة ثبات الفيروس Stability الاعتبار الأول فى هذه العملية.

بخلاف ما سبق تستعمل طرق مختلفة لترسيب الفيروس منها: ما هو كيماوى وما هو طبيعى.

أ - الطرق الكيمائية لترسيب الفيروس:

١ - التمليح Salting-out وهو عبارة عن إضافة أملاح ذائبة بتركيزات مختلفة، مثل كبريتات الأمونيوم أو أملاح الزنك وكبريتات البروتامين. وقد وجد أن الالبيومين يترسب عند تشبع ١٠٠٪ بواسطة كبريتات الأمونيوم، أما الجلوبيولين فيترسب عند

تشبع ٥٠٪.

٢ - الترسيب بواسطة الكحولات، وفيها تستعمل بعض الكحولات المنخفضة Lower al-cohols، مثل الميثانول والإيثانول.

٣ - الترسيب عند درجة التأين Isoelectric points، وبواسطتها تمكن Best 1936 من الحصول على مستخلص نقى لفيروس موزيك الدخان، واستعملها آخرون باستعمال حمض الكلوروودريك.

ب - الطرق الطبيعية لترسيب الفيروس:

تتوقف عادة على أساس اختلاف حجم جزيئات الفيروسات والمواد الأخرى فى معلق العصير. وتستعمل هذه الطرق عادة لتنقية فيروسات النبات غير الثابتة unstable، والتى من السهل تأثرها بعمل الأملاح المركزة أو التغيير الواضح فى الـpH. يستعمل الطرد المركزى بدرجات مختلفة تتغير من دوران بطئ، يزيل بقايا الأنسجة أو التلوث البكتيرى إلى دوران سريع يجمع الفيروس ويكتله.

الفيروسات كبيرة الحجم يستعمل لها: دوران مركزى بطئ بمعدل ٣٠٠٠ دورة/ دقيقة فى دوران أفقى، أو ٤٥٠٠ دورة/ دقيقة دوران على زاوية، أما الفيروسات صغيرة الحجم فيستعمل لها دوران مركزى سريع بجهاز يسمى Quality heads تحمل أنابيب مختلفة الحجم كبيرة، ويصلح أيضاً للتنقية Sharpless Centrifuge، والتى تترسب فيها المادة من طبقة رفيعة لسائل يغطى السطح الداخلى لأسطوانة مفرغة تدور.

كذلك يستعمل الطرد المركزى فائق السرعة Ultracentrifuge فمثلاً تنقية فيروس النقط الحلقية للدخان Tobacco ring spot virus تجرى على درجات حرارة منخفضة وبالطرد المركزى للعصير المستخلص من الأوراق المصابة، أولاً فى آلة طرد مركزى عادية لفصل الأجزاء الغريبة كبيرة الحجم، ثم بعد ذلك بالطرد المركزى ٣٠٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة تصل إلى ١٫٥ ساعة، وبذلك يرسب الفيروس على شكل راسب كثيف فى قاع الأنبوبة. يحتوى هذا الراسب أيضاً على أجزاء صبغية (صبغات يفصل عنها الفيروس باستعمال ١/١٠ ع محلول

فسيولوجى على درجة pH 7 بهذا يعلق الفيروس فى السائل، وتظل الصبغات فى حالة غير ذائبة، تفصل بواسطة الطرد المركزى المتوسط والسائل العلوى يفصل ويستعمل له الطرد المركزى ultra لمدة ساعة ونصف وهكذا يكرر الدوران البسيط ثم الدوران السريع ultra ثلاث إلى أربع مرات، وبذلك يمكن الحصول على تحضير متجانس من الفيروس.

كما تستعمل للتنقية طريقة Density gradient centrifuge حيث إن جزيئات الفيروس تتركز فى طبقات خاصة فى محلول فى الوسط بواسطة الكثافة النسبية density gradient من القمة للقاعدة؛ نتيجة تحضيرات فى محاليل السكروز أو الجليسرول glycerol تختلف كثافتها ولزوجتها، ويمكن رؤية المحتويات Fractions بواسطة الضوء.

كل هذه الطرق تؤدى إلى فصل الفيروسات التى تختلف فى حجمها عن المحتويات غير الفيروسية لمعلق العصير.

هذه الطرق ربما تسبب ضياع بعض الفيروس إذ يتكون من جزيئات مختلفة الحجم، كذلك يفقد جزء من نشاط الفيروس خاصة فى آلة الطرد المركزى لعدم الترسيب الكلى.

ويمكن أن يبلور الفيروس فى المحلول النقى الخالى من الصبغات بإضافة محلول ٥٪ من حمض الخليك إلى المخلوط، الذى يحتوى على فيروس موزيك الدخان.

المادة المنقاة بطرق مختلفة يمكن تعريضها لعدد من الاختبارات لدراسة صفاتها وعلاقتها بالنشاط الفيروسى. والمهم فى هذه الدراسة هو مقارنتها بمواد يحصل عليها بالطرق نفسها من عوائل غير مصابة.

والخطوة الأولى هى إثبات أن مثل هذه المواد يمكن عزلها من عوائل مختلفة مصابة بالفيروس نفسه، ولا يمكن عزل مواد مثلها من عوائل غير مصابة.

وعند إجراء التنقية يراعى الآتى:

أولاً: يجب أن تكون السلالة الفيروسية المستخدمة سريعة التضاعف فى العائل لتعطى تركيزاً عالياً من الجزيئات الفيروسية، وبالإضافة إلى ذلك يجب أن تكون ثابتة من الناحية الوراثية أى لا يحدث فيها طفرات قد تؤدى إلى تغييرها.

ثانيًا: يجب عند اختبار العائل المستخدم لزراعة هذه السلالة أو الفيروس أن يكون سهل الزراعة سهل العدوى متماثلاً وراثيًا، ويجب أن يكون محتواه من العصير كبيراً مناسبًا للسلالة الفيروسية المستخدمة؛ حتى يعطى أعلى تركيز من الجزيئات الفيروسية. يكون النبات خاليًا من المواد التى تؤثر على الفيروس، والتى تتعارض مع عمليات التنقية مثل الصبغات والأحماض والإنزيمات المؤكسدة. وتعتبر النباتات الخشبية عادة غير ملائمة لإكثار الفيروسات لوجود نسبة مرتفعة من هذه المواد بها. وإذا كان هناك من الضرورة استخدام هذه النباتات فيجب استخدامها فى عمر صغير أو أخذ أزهارها، حيث تعتبر الأزهار فى هذه النباتات أنسب الأنسجة لاستخلاص الفيروس بكمية كبيرة، وتستخدم غالبًا لهذا لغرض النباتات العشبية والحولية حيث تعتبر أكثر ملاءمة كمصدر لتنقية الفيروس عن النباتات الخشبية.

ثالثًا: تؤثر العوامل الجوية والبيئية على تركيز الفيروس داخل النباتات العائل، فقد لوحظ أن زيادة تركيز الفيروس فى مادة الحقن يعطى تركيزاً عاليًا من الفيروس فى النبات، كذلك لوحظ أن درجة الحرارة وكذلك الإضاءة لها تأثير كبير على محتوى النبات من الفيروس؛ فالحرارة من أهم العوامل التى تؤثر على تركيز الفيروس، فيصل أعلى تركيز عادة فى درجة الحرارة العالية، ولكنه يستمر لفترة قصيرة عنه فى حالة الحرارة المنخفضة، وكذلك يتأثر انتشار الفيروس داخل النبات بدرجة الحرارة. ففى درجات الحرارة المنخفضة يكون انتشار الفيروس بطيئًا فى النبات العائل، وينتج عن ذلك انخفاض فى تركيز الفيروس فى العائل.

رابعًا: عند استخلاص الفيروس من النبات العائل، يجب أخذ الاحتياطات الكفيلة حتى لايحدث تلف للجزيئات الفيروسية فى العصير الخام المجهز من النباتات المصابة؛ لأن الفيروس فى هذه الحالة يعتبر فى وسط مخالف لذلك الذى كان موجوداً عليه فى الخلية الحية، ومن أمثلة المواد التى توجد فى العصير الخام وتؤثر على الجزيئات الفيروسية Polyphenol oxidase وهذه يمكن إبطال مفعولها باستخدام Sodium diethyl dithiocarbamate بتركيز ٠,٠١ مولر، وكذلك يؤثر إنزيم Nuclease الموجود فى العصير الخام على الجزيئات الفيروسية، ويمكن التقليل من تأثيره بإضافة مادة Bentonite إلى العصير الخام، حيث يوقف

تأثير RNAase.

خامساً: يجب اختيار الطريقة المناسبة للتنقية حسب طبيعة الفيروس المراد تنقيته. وبعد إتمام عملية التنقية وقبل التحليل الكيماوى يجب تقدير نقاوة الفيروس، ولا يوجد اختبار كافٍ مفرد للتأكد من هذه النقاوة، ولكننا نتأكد منها بعدة اختبارات. فيستخدم الطرد المركزى لتقدير درجة تجانس تحضير الفيروس، وعلى الأخص حجم الفيروس وكثافة الجزيئات ووجود نقطة ترسيب واحدة تبرهن على وجود نوع واحد من الجزيئات، ووجود منطقتين يدل على وجود نوعين من الجزيئات وهكذا، ومن الخصائص المهمة للنقاوة هى التجانس الكهربى الكيماوى، والذى يقدر بجهاز الهجرة الكهربائية Electrophoresis ويمكن استخدامها كدليل جيد لتجانس تحضير الفيروس.

كما يمكن استخدام الميكروسكوب الإلكترونى للاختبار المباشر للتجانس الطبيعى لتحضير الفيروس، ومن الطرق الأخرى المستخدمة فى قياس درجة النقاوة فى الفيروس هى: Constant solubility test أو Immunochemical methods.

الفصل الثانى

الخواص الطبيعية والكيميائية لفيروسات النبات

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF PLANT VIRUSES

أولاً: الخواص الطبيعية للفيروس: PHYSICAL PROPERTIES OF VIRUSES

١ - شكل وحجم الفيروس Shape and size of viruses:

منذ زمن طويل والعلماء مهتمون بدراسة شكل وحجم وتركيب الفيروس، ولقد أوضح إيفانوفسكى أن مسبب مرض موزيك الدخان ذو شكل عصوى، وحاول العلماء بعد ذلك تحديد أشكال الفيروسات واستخدموا لذلك طرق عديدة يمكن ترتيبها حسب اكتشافها أو استخدامها إلى:

الترشيح - الترسيب - استخدام الميكروسكوب الضوئى - استخدام ميكروسكوب الأشعة فوق البنفسجية - استخدام ميكروسكوب اختلاف الطور الضوئى - استخدام الميكروسكوب المقطب للضوء - استخدام الميكروسكوب الإلكترونى.

ويعتبر استخدام الميكروسكوب الإلكترونى فى وقتنا الحاضر من أهم الطرق فى تعرف شكل وحجم الفيروسات المختلفة. وتقدمت قدرة الفحص بالميكروسكوب الإلكترونى كثيراً باكتشاف وسائل جديدة لعمل مقاطع فى الخلايا المصابة بالفيروس رقيقة جداً يتراوح سمكها بين ١٠-٢٠ ملليميكرون، والتى بواسطتها أمكن معرفة شكل الفيروس فى مراحل حياته المختلفة.

شكل الفيروس Shape of Virus

أمكن بواسطة الميكروسكوب الإلكترونى تمييز أجسام فى أنسجة النباتات المصابة بأمراض فيروسية، لم ينجح فى رؤيتها داخل أنسجة النباتات السليمة. وإذا ما كان فى بعض الأحيان يلاحظ أجزاء بالخلية النباتية خيطية أو عصوية أو كروية، فإنه يمكن تمييزها بسهولة

عن الأشكال الفيروسية.

وفى عام ١٩٥٥ اعتبر ريجوكوف Rijkov أن الجزيئات الموجودة فى عصير النباتات المصابة والمنقى كيماويًا شكلاً للفيروس أطلق عليه اسم (جراثيم فيروسية Virus spores) وأطلق عليها غيره من العلماء جزيئات الفيروس.

حجم الفيروس : Size of Virus

أما مقاييس جزيئات الفيروس فتختلف اختلافًا بينًا. ويمكن تقدير هذه المقاييس بالدقة الكافية بواسطة الصور المأخوذة بالميكروسكوب الإلكترونى لتحضيرات نباتات مصابة، إلا أنه عندما يكتب الباحثون عن هذا الفيروس أو ذاك، يلاحظ أنه عادة ما يعطون مقاييس مختلفة لنوع الفيروس الواحد، ولكن من المعروف أن مقاييس جزيئات الفيروس ثابتة بالنسبة لكل نوع كما هو الحال بالنسبة للشكل.

هذا التباين فى مقاييس جزيئات الفيروس الواحد ربما يعزى سببه إلى طريقة تحضير العينات، وما تبع ذلك من تكسر لجزيئات الفيروس علاوة على ما قد يكون لعمر الفيروس من أثر فى ذلك. لهذا رأى بعض البحاث أن المقاس الذى يمثل أكبر عدد من جزيئات الفيروس يمثل طول جزىء الفيروس بصفة عامة. وقد كتب بروتسنكو وليجونكوفا Protcenko & Legonkova (١٩٦٠) أن جسيمات كثير من الفيروسات تحتفظ بشكلها فى الظروف العادية، وعملا مقارنة لشكل جسيمات فيروس موزيك الدخان، وجسيمات فيروس البطاطس الناتجين عن هرس النسيج المصاب فى هاون بمساعدة الرمل ودون مساعدة الرمل، ووجد انه لا يوجد فرق واضح فى طول جسيمات الفيروس الواحد الناتجة عن هرس النسيج المصاب، بمساعدة الرمل أو هرسه دون استعمال الرمل.

وأصبح معروفًا أن مقاس جسيمات أو جزيئات الفيروسات يختلف اختلافًا كبيرًا؛ فجزيئات فيروس نيكروزيس الدخان قطرها ١٧ نانومتر، وجزيئات فيروس اللون البرونزى فى نبات الطماطم قطرها ١٠ نانومتر. كذلك طول جزيئات فيروس موزيك الدخان ٣٠٠ نانوميتر، أما فيروس X البطاطس فطول جزيئاته ٥٠٠ نانومتر. وفيروس اصفرار البنجر طول الخيط فيه ١٢٥٠ نانوميتر، بينما طول خيط فيروس تخطيط البسلة ٥٠٠٠ نانوميتر. والجدول التالى يبين شكل ومقاس بعض فيروسات النبات.

جدول (٥ - ١) : شكل ومقاييس جزيئات بعض فيروسات النبات مقدرة باستعمال الميكروسكوب الإلكترونى.

الفيروس	شكل الجزئ	مقاس حجم الجزئ بالمليميكرون
موزيك قصب السكر	عصوى	٦٣٠ X ١٥
موزيك الدخان	عصوى	٢٨٠ X ١٥
موزيك الخيار / ٢	عصوى	٢٨٠ X ١٥
X البطاطس	عصوى	٥٠٠ X ١٠
التجعد الأصفر للبطاطس	عصوى	٣٠٠ X ٥٠
موزيك الفجل	عصوى	١٠٥ X ٢٥
تخطيط البسلة	خيطى	٥٠٠٠ X ١٤
النقط الحلقية فى الدخان	كروى	١٢
الموزيك الأصفر للفت	كروى	٢٠
الموزيك الجنوبى للفاصوليا	كروى	٢٥
موزيك الكوسة	كروى	٣٠
برونز الطماطم	كروى	٩٠
موزيك الخيار / ١	كروى	٣٥

١- نقطة فقدان الفيروس لنشاطه الباثولوجى بالحرارة:

Thermal Inactivation Point

تتأثر الفيروسات وهى خارج عوائلها بالحرارة العالية بدرجات مختلفة، وتلعب حالة العصير دوراً كبيراً من هذا الموضوع (فمثلاً يفقد فيروس موزيك الدخان تأثيره عند تسخينه على درجة ٧٥°م لمدة عشر دقائق إذا كان الوسط على pH7، أما إذا كان الوسط pH 5.5، فيفقد تأثيره إذا ما عرض لحرارة ٥٩ م لمدة عشر دقائق.

وتميز الفيروسات المختلفة فيما بينها بنقطة فقدان نشاطها، وهى عبارة عن (درجة الحرارة التى إذا ما تعرض لها الفيروس لمدة عشر دقائق فقد قدرته على إحداث الإصابة).

فمثلاً يتأثر فيروس موزيك الدخان بارتفاع درجات الحرارة تأثرًا تدريجيًا، ويتم التأثير

على درجة ٩٣°م لمدة ١٠ دقائق. وفيروس تيكروزيس الدخان يتأثر بدرجة حرارة منخفضة وهى عند ٥٠°م لمدة ١٠ دقائق، يتسبب له تأثير نسبى فى حين أن نقطة فقدان نشاطه الباثولوجى حوالى ٨٠°م – ومن الفيروسات ما هو مقاوم لدرجات الحرارة العالية مثل فيروس تجعد أوراق البسلة، وتصل نقطة فقدانه لنشاطه إلى ١٠٨°م.

٣- التجميد : Freezing

يتحمل عصير النبات المصاب درجات الحرارة المنخفضة، بينما تقل قدرة المستحضرات النقية للفيروس على تحمل مثل هذه الدرجات – وإذا أضيف إلى مثل هذه التحضيرات النقية جلوكوز أو أملاح، فإن ذلك يرفع من درجة مقاومتها وثبوتها.

وللوسط الموجود به الفيروس تأثير كبير؛ فالتحضير النقى لفيروس موزيك الدخان يتحمل التجميد فى الوسط المتعادل pH 7.0، ولكنه يفسد إذا تمت عملية التجميد فى وسط حامضى.

٤- التجفيف : Hydration

معظم الفيروسات النباتية تفسد بسرعة بالتجفيف العادى للأنسجة المصابة أو العصير حتى فيروس موزيك الدخان، الذى يتميز بقوة مقاومته وثباته، فإنه أمام التجفيف يفقد جزءاً ملحوظاً من نشاطه وإذا ما جففت الأوراق المصابة بسرعة على درجة ١°م، ثم حفظت الأوراق فى مكان خالٍ من الرطوبة فإنه بذلك يمكن للفيروسات الثابتة أن تحتفظ بحيويتها لبضعة أشهر، أو ربما لسنة. ومن هذه الفيروسات موزيك الخيار رقم ١ وفيروس البقع الحلقية فى الدخان وفيروس X البطاطس.

٥- تأثير الأشعة فوق البنفسجية (الالترافيوليت) : Effect of Ultraviolet

جميع الفيروسات تفسد بسرعة عند تعرضها للألترا فيوليت، ويتم فقدان هذا النشاط عند موجة ٢٦٠ ملليميكرون – هذه الأشعة تمتص بواسطة أحماض النواة، وكذلك الموجات الأقصر من ذلك، ذات تأثير قوى على نشاط الفيروس – أما الموجات الطويلة التى تزيد عن ٣٠٠ ملليميكرون فإن تأثيرها ضعيف، وتحتفظ الفيروسات الفاقدة لنشاطها بواسطة

الالترافيوليت بخواصها الطبيعية وصفاتها كأنتيجن.

بعض الفيروسات الفاقدة لنشاطها نتيجة لتعرضها للالترافيوليت يمكن أن تعود لها حيويتها، إذا ما عرضت الأنسجة المصابة للضوء العادى المرئى – وعودة النشاط لا تتم إذا ما كانت الفيروسات خارج خلايا نسيج العائل.

يختلف تأثير الأشعة الضوئية باختلاف الفيروس، ويحتمل أن لا يظهر تأثير الضوء مباشرة، ولكن بعد مرور بعض الوقت يقدر بحوالى ٣٠ دقيقة، حتى تزداد جزيئات الفيروسات، ثم يستمر التأثير لمدة ساعة بعدها يبطل. ولضمان التأثير الضوئى فيكفى تعرض الفيروس للضوء لمدة ١٠–١٥ دقيقة.

٦- الضغط : Pressure

بعض الفيروسات تظهر مقاومة كبيرة نسبيًا تحت الضغط العالى، فيفسد فيروس موزيك الدخان الموجود فى العصير إذا ما عرض لضغط ٥٠٠٠٠ جو فساداً ضعيفًا، بينما يفسد فيروس نيكروزيس الدخان فى ضغط ٣٠٠٠ إلى ٥٠٠٠ جو، حيث إنه أقل منه مناعة.

٧- مدة حفظ الفيروس لحيويته : Ageing

يفسد الفيروس الموجود فى عصير النباتات المصابة تدريجيًا، إذا ما ترك على درجة الحرارة العادية، وذلك نتيجة لفساد المواد الموجود بها الفيروس، وكذلك عمل أكسجين الهواء. ويمكن إطالة مدة بقاء الفيروس بحالة صالحة إذا ما أضيف للعصير مواد حافظة، وتختلف الفيروسات فى مدة بقائها حافظة لنشاطها اختلافًا كبيراً. فمثلاً فيروس موزيك الدخان يحتفظ بحيويته سنينًا طويلة، وهو فى العصير بينما يفسد فيروس برونز الطماطم خلال بضع ساعات.

٨- نقطة التخفيف النهائية : Dilution end point

لتركيز الفيروس فى محلول الحقن تأثير كبير، فعند درجة معينة من التخفيف بالماء تصبح الإصابة متعذرة، وذلك ربما يكون نتيجة لقلة جزيئات الفيروس التى تدخل الخلية، وبالتالى فالفرصة تكون بسيطة أمام الجزيئات التى تسمح لها الظروف بالتكاثر – وعلى ذلك

تتوقف الإصابة على عدد جزيئات الفيروس التى تدخل الخلية.

وتسمى درجة تخفيف الفيروس التى بعدها لايحدث أى إصابة بنقطة التخفيف النهائية Dilution end point.

ثانياً: الخواص الكيميائية للفيروس: Chemical properties of Virus

١ - ترسيب الفيروس:

يمكن ترسيب الفيروس بواسطة الكيماويات التى ترسب البروتينات مثل الأمونيوم أو الكحول.

٢ - تقدير تركيز الفيروس بالطرق الكيماوية:

ولهذا الغرض تستعمل طريقة كلداهل في تقدير النيتروجين، ومنها تقدر كمية الفيروس فى المحلول.

٣ - التكوين الكيماوى للفيروس: استعملت بعض الطرق الحديثة مثل:

أ - الالكتروفوريسس Electrophoresis

تبنى على أساس هجرة migration الجزيئات فى مجال كهربائى، وربما يتم هذا فى وسط سائل أو على ورق. وتتحرك الأجزاء او الجزيئات نحو القطب السالب أو تبقى ساكنة (وتقدير اتجاه ومسافة الحركة فى وقت حقن) طبقًا لشكل وحجم الجزىء والشحنة الكهربائية المحولة بواسطة الجزىء وقوتها ودرجة pH للوسط.

وتؤدى هذه الطريقة إلى فصل الجزيئات المختلفة الموجودة فى مخلوط، وتساعد فى تعريفها.

ب - الكروماتوجرافى: Chromatography

وهذه الطريقة تقيس حركة البروتينات والأحماض الأمينية والجزيئات الاخرى فى مجال غير كهربى، ويمكن توضيح هذه التحركات على ورق، أو فى أعمدة تحتوى على سليلوز أو Diatomacoaus earth، ووجد أن استعمال الورق Paper chromatography مفيد لفصل

وتعريف الأحماض الآمينية. ويحلل البروتين إلى أحماض آمينية، وتوضع نقطة صغيرة من محلول مائى كمخلوط الحمض الأمينى على شريط ورق ترشيح قرب نهايته، الذى يغمس بدوره فى مذيب عضوى يحتوى على الماء.

ويبدأ المذيب فى التحرك إلى أعلى الورقة على النقطة المحتوية على الحمض الآمينى، وتحمل الأحماض الآمينية المختلفة بواسطة المذيب إلى أبعاد مختلفة نحو قمة ورقة الترشيح، معتمدة على درجة ذوبانها فى المذيب العضوى، مقارنة مع درجة ذوبانها فى الماء، ويمكن تقدير النقطة النهائية التى توقف عندها الحمض الآمينى باستعمال كيماويات خاصة، التى تسبب لوناً نتيجة لتفاعلها مع الحمض على الورقة. وبالرجوع إلى الأماكن السابقة لتوقف الأحماض الآمينية عندها.. فإنه من الممكن تحديد وضع الأحماض الموجودة فى مخلوط مجهول.

التحليل الكروماتوجرافى ليس قاصراً على الأحماض الآمينية، ولكن يمكن استعماله فى عزل وتعريف أنواع كثيرة من الجزيئات Moleciules.

جـ- وطريقة أخرى لفصل وتحديد مكان وتعريف المواد يمكن الوصول إليه بطريقة مختلفة عن استعمال ورق الإلكتروفوريسس Paper electrophoresis، والكروماتوجرافى، وفيها توضع قطرة من مخلوط به مواد على ورقة ترشيح بقرب نهايتها السفلى، ويستعمل التيار الكهربى. يفصل الإلكتروفوريسس الجزيئات أفقياً بين القطبين.

وتضاف بعد ذلك المذيبات العضوية فتسبب هجرة للجزيئات المختلفة فى بعض الصفات (الشحنة، الوزن... إلخ).

وتخضع طريقة Columun Chromatography للأسس نفسها مثل Chromatography وهى هجرة الجزيئات خلال عمود زجاجى، يحتوى على مادة ممتصة متجانسة Suitable absorbent ولكن باستعمال تكنيك مختلف تضاف التحضيرات الكيمائية إلى قمة الأعمدة، وتتحرك إلى أسفل العمود بقوة الجذب بواسطة مضخة خاصة. وفى أثناء هجرة التحضير تحدد مواضع المواد المختلفة المكونة للمخلوط.

٤ – اختبارات التلوين : Colour tests للبروتينات والكربوهيدرات

تستخدم تلك الاختبارات للكشف عن الفيروس ومركباته :

أ – اختبار بيوريت Bieuret reaction وهو خاص بروابط الببتيدات Peptide Linkage وفيه يضاف ٠,٥ سم٣ من فيروس نقى إلى ٠,٥ سم٣ من ١٠٪ أيدروكسيد الصوديوم ثم تضاف نقطة أو اثنتان من ١٪ محلول كبريتات النحاس، فإذا تكون لون أزرق بنفسجي فإن هذا يدل على وجود رابطة ببتيدية.

ب – تفاعل ميلون Melon test وهو الكشف عن الـ Tyrosine ويتركب محلول ميلون من ١ جزىء ٤٠٪ حامض النتريك إلى ٩ أجزاء ماء مقطر، ثم يشبع فى خلال عدة أيام بنترات الزئبق ثم يرشح– يضاف محلول فيروس نقى، ثم يسخن فى حمام مائى ساخن؛ فإذا تلون بلون أحمر فإن ذلك يدل على وجود الفيروس.

جـ – اختبار موليش Molish test، وهو الكشف عن الكربوهيدرات يضاف ١ سم٣ من حامض كبريتيك مركز إلى محلول فيروس باحتياط على جانب الأنبوبة، حتى لايختلط بالمحلول ويرسب فى القاع ويسخن فى حمام مائى. وتتكون حلقة بنفسجية بين الحامض ومحلول الفيروس.

ثالثاً : تأثير المواد الكيمائية على الفيروس

كثير من المواد الكيماوية لها القدرة على إبطال مفعول الفيروسات، ومنها المواد التى تؤثر على البروتين مثل أملاح المعادن الثقيلة والأحماض القوية وكثير من المواد الأخرى. بتعريض الفيروس إلى ٣ – ٥٪ ليزول لمدة خمس دقائق يزيد تأثير الفيروس كذلك برمنجنات البوتاسيوم تستعمل كمطهر ضد فيروس موزيك الدخان.

يؤثر الفورمالدهيدو H_2O_2 على الفيروس، والتأثير فى بعض الحالات على الفيروس يكون جزئياً وعكسياً، فمثلاً يزول تأثير الفورمالدهيد بعمل تحلل مائى لفيروس موزيك الدخان فيعود إليه نشاطه جزئياً.

لوحظ التأثير العكسى على فيروس موزيك الدخان، أثناء تعرضه لمحلول قلوى

Alkalization، وفى هذه الحالة يعود للفيروس نشاطه إذا ما عمل له تحلل مائى بواسطة الماء.

ولقد حصل أجاتوف عام ١٩٤٧ على هذه النتيجة، واقترح أنه فى هذه الحالة فإن النشاط ربما يكون مرتبطًا بمجموعة الكربوكسيل لبروتين الفيروس المقيد.

والتأثير المثبط على هذا الفيروس يسببه أيضاً التربسين، فيرتبط إنزيم التربسين بالبروتين مكوناً مركب غير نشط، وعند كسر الرابطة فى المركب فإن الإنزيم يفترق أثناء تخفيف المحلول بالماء فيعود النشاط للفيروس.

فيروس X البطاطس أقل ثباتاً عن فيروس موزيك الدخان؛ لذلك ففى حالة ارتباطه بإنزيم التربسين لايتأثر فقط، ولكنه بمرور الوقت يحدث خلل للبروتين.

من هذا يمكن القول بأنه لايوجد هناك تفسير واحد ثابت فى عمل المواد المختلفة المؤثرة على الفيروسات المختلفة، وأوضح مثل على ذلك أن الجليكوبروتين المستخلص من *Phytolaca esculenta* يؤثر بشدة على نشاط فيروس الدخان، وفى الوقت نفسه لايؤثر على البكتريوفاج.

يتوقف نشاط الفيروس بشدة على تركيز أيونات الأيدروجين، وبالمستخلصات حيث يحدث تجميع aggregation للمستخلصات عند pHİ0 وأعلى، مع فقد نشاطها وبعض التأثيرات يحدث عند pH8. تختلف مقاومة الفيروسات المختلفة للوسط الحامضى اختلافاً ظاهراً فمثلاً يتأثر فيروسX البطاطس كلية فى وسط أقل من pH 4,3، أما فيروس موزايك الدخان فإنه يقاوم فى أقل من pH2.

يحتفظ الفيروس بنشاطه بعد التحميض المتوسط فعند عدوى نباتات الدخان فإنه تظهر عليها مظاهر الإصابة، ولا يفترق الفيروس المتكاثر والمعزول من هذه النباتات عن الفيروس الأصلى. على أساس كل ما سبق يمكن القول بأن مجموعة الأوكسى ومجموعة الكربوكسيل تلعبان دوراً مهمّاً فى نشاط الفيروس، وكذلك بعض أجزاء من مجموعة الآمين. ولهذا يمكن اعتبار أن التركيب البيولوجى للفيروس يحدده مجموع كل خواص مكوناته الكيميائية وتركيبه الطبيعى.

رابعاً : خواص الفيروس كأنتيجين

تطلق كلمة أنتيجين على المواد التى إذا حقنت فى دم جارٍ لحيوان، يكون نتيجة لذلك تكون أجسام مضادة لها صفة الدخول معها فى تفاعل. وهناك كذلك مواد تحمل نسبة أنتيجين غير كامل أو Haptens، وهى مواد ليس من صفتها تكوين أجسام مضادة في جسم الحيوان، ولكن يمكنها الدخول فى تفاعل مع الأجسام المضادة، التى تكونت ضد الأنتيجين ويكون ذلك نتيجة لتوافق تركيبى.

والبروتينات هى مواد أنتيجينية، وتتكون الفيروسات من نيوكليوبروتين، وتحتوى على بروتين، ولذا فهى أيضاً أنتيجنات.

الباب السادس

علاقة الفيروس بالنبات

RELATION BETWEEN
THE VIRUS AND PLANT HOST.

الفصل الأول

دخول الفيروس، وتضاعفه وانتشاره داخل العائل

Invasion, replication and Spread of Virus in the Plant host

على الرغم من المحاولات المتعددة، لم تعرف للآن طريقة للاحتفاظ بمزرعة فيروس على بيئة غذائية صناعية إذ إن حياة الفيروس مرتبطة بوجود خلايا العائل القابل للإصابة، وبذلك فإن الفيروسات ذات علاقة تطفلية إجبارية مع العائل.

بخلاف البكتريا وبعض فيروسات الإنسان والحيوان فليس لفيروسات النبات طريق لدخول الخلايا النباتية إلا عن طريق الجروح؛ إذ إن إصابة النبات دائمًا ما تظهر كإصابة جرحية، إذا لم تؤخذ حالات النقل عن طريق البذور أو عن طريق حبوب اللقاح فى الاعتبار، ويدخل الفيروس النبات عن طريق الجروح الناتجة عن سبب ميكانيكى أو بزيارة الحشرات للخلية أو عن طريق نبات متطفل كالحامول. أما عند رش النبات السليم بمعلق مركز للفيروس أو إدخال الفيروس فى المسافات بين الخلايا عن طريق التفريغ أو عن طريق الثغور فلا تتم الإصابة.

زراعة فيروس النبات:

ويمكن زراعة فيروس النبات فى المعمل بعمل جروح صناعية فى خلايا العائل، بشرط أن تكون هذه الجروح دقيقة جداً حتى لا تموت الخلايا المجروحة، مما يؤدى إلى عدم حدوث العدوى. تعمل هذه الجروح بواسطة الاحتكاك البسيط لسطح الورقة باليد أو بقضيب من الزجاج ذى قاعدة مبططة خشنة نوعا على هيئة حرف L، وربما تستعمل عدة مواد للمساعدة فى إحداث تلك الجروح مثل الرمل الناعم أو مسحوق الصنفرة Carborandum أو الزجاج المسحوق ترش على سطح الورقة، يلى ذلك حقن النبات بواسطة دهان سطح الورقة بقطعة من القطن أو الشاش مبللة بعصير نبات مصاب.

وبعض الفيروسات التى كان نقلها صعبًا بواسطة مسح سطح الورقة بالعصير مثل فيروس البطاطس، أصبح من السهل نقلها إذا ما استعملنا المواد المساعدة لإحداث الجروح الصغيرة.

وهناك طريقتان للاحتفاظ بمزرعة فيروس نبات :

١ - استعمال نبات قابل للإصابة يزرع فى الصوبة، وعند العمل مع نبات حولى فيمكن الاستمرار فى حفظ مزرعة الفيروس عن طريق تمريرها من نبات، أوشك أن ينهى حياته إلى نبات صغير، وهذا يمكن أن يتم فى حالات ما إذا كان الفيروس ينتقل ميكانيكيًا بواسطة الحقن بالعصير. أما فى حالة الفيروسات التى تنتقل بواسطة الحشرات فقط، فإن التمرير يمكن أن يجرى بواسطة التطعيم بجزء من نبات مصاب على نبات سليم أو باستعمال حشرات نظيفة ناقلة. وفى بعض الأحوال كما هو الحال فى زراعة فيروس موزايك الدخان لا تظهر أى مشاكل؛ إذ إنه من السهل زراعة نباتات دخان، ثم حقنها بالفيروس الذى يتكاثر وينتشر خلال النبات بأكمله ويمكن الحصول على الفيروسات من أى جزء من النبات. ولكن ليس كل الفيروسات قادرة على أن تصيب الدخان وتتكاثر بداخله، بل لكل فيروس عائل خاص به يتكاثر بداخلها، وبعضها نجده سهل الزراعة والبعض الآخر نجد به صعوبة، كما أنه فى أحوال كثيرة لا يتكاثر الفيروس فى داخل كل أجزاء جسم العائل، بل يتكاثر فى أنسجة بعض أجزاء الجسم فقط، وبذلك يكون حقن نبات أو جسم بأكمله ليتم التكاثر منه من سبيل ضياع الوقت.

٢ - أمكن زراعة كثير من الفيروسات فى الأعضاء المعزولة، وسميت هذه الطريقة بطريقة زراعة الفيروس فى الأنسجة Cultivation Of Virus in Tissue، وفى هذه الطريقة تؤخذ هذه الأنسجة نظريًا من أى جزء من النبات.

تضاعف الفيروس :

يتضاعف الفيروس بمجرد دخوله خلايا العائل النباتى. وللآن لم تُبحث جيداً طريقة تضاعفه، وأكثر ما درس من فيروس النباتات هو فيروس موزايك الدخان، ولقد لوحظت مرحلتان فى تطور أو تضاعف هذا الفيروس، رغمًا عن أنه ربما يكون هناك أكثر من هاتين المرحلتين وهما :

أولا : الطور الخضرى أو مرحلة الخسوف Vegetative Phase :

وهو يبدأ بدخول الفيروس خلايا العائل، وبعد ١ - ٢ ساعة ومن عدوى العائل القابل

للإصابة، ويمتد إلى نحو ٩ – ١٠ ساعات، بعدها ينتقل الفيروس إلى الطور الثابت، وذلك في ظروف الحرارة المثلى حسب Coukhov & Kapitza (1956).

والفيروس في هذا الوقت ليس له القدرة على إصابة نباتات جديدة باستعمال الطرق المعتادة للحقن، علاوة على أنه يفسد بسرعة عند تهتك النسيج في حالة تحضير مادة الحقن، وأظهرت دراسة تطور الفيروس أنه عند حفظ أوراق الدخان المحقونة في الظلام، وفي ظروف حرارة مرتفعة (٣٦°م) للسلالات المقاومة للحرارة، فإن الفيروس يتضاعف ولكن انتقاله إلى الطور الثابت منعدم أو يقل بدرجة كبيرة. وفي هذه الظروف تتجمع كميات كبيرة من الطور الخضري للفيروس في خلايا الأوراق. وعند وضع الأوراق في أحوال مناسبة للانتقال للطور الثابت على درجة ٢٨°م فإن الانتقال لهذا الطور يتم في مدة أقل نسبيًا.

ففي حالة حفظ الأوراق المتجمع فيها الطور الخضري للفيروس لمدة ٢ – ٣ ساعات على حرارة مناسبة تظهر فيها كمية كبيرة من الفيروس القابل لإحداث العدوى.

ثانيًا: الطور الثابت: Dormant Phase

وينتقل إليه الفيروس كما يظهر نتيجة لعدم ملاءمة الوسط للطور الخضري، وربما لتجمع نواتج التبادل الغذائي، التي تعيق استمرار الفيروس من التكاثر في اتجاه الطور الخضري.

والفيروس في هذا الطور عبارة عن جزيئات لها صفة العدوى، ويمثل تضاعف الفيروس عملية بيولوجية معقدة تنتهي بتكوين جزيئات ثابتة لها صفة العدوى، فمن المعروف أن الفيروس يحتوي على محتويين كيماويين لحمض نووي معدى RNA, DNA وبروتين الفيروس – ولم يعرف أن البروتين يحتوي على أي نشاط إنزيمي، ولا يمكن بواسطته فقط إحداث إصابة، وظهر أنه يعمل كوقاء لحمض النواة.

أما الحمض فمن الجهة الأخرى يحمل قدرة إحداث العدوى، والتي ينتج عنها إنتاج جزيئات فيروسية شبيهة بالأصل. ولهذا يظهر أنه يحمل المعلومات الوراثية ليس لإنتاج نفسه فقط، ولكن لإنتاج بروتين الفيروس أيضًا. ورغم أن حمض DNA هو المسئول عن المعلومات الوراثية لكل أنواع النباتات والحيوانات، إلا أن الفيروسات تعتمد على حمض

RNA أو DNA فى حمل المعلومات الوراثية.

ولقد درس حمض النواة RNA الموجودة فى فيروس موزايك الدخان بتوسع باستعمال الميكروسكوب الإلكترونى، واستعمال أشعة X.

وقد أوضح Gierer Schramm (1956) وظيفة RNA فى فيروس موزايك الدخان، حينما توصل إلى عزله، ووجد أن له القدرة على إحداث العدوى فى غياب البروتين.

وتمكن Frankel Conrat (1957) من خلط حمض لفيروس موزايك الدخان مع بروتين سلالة أخرى، وحقن به، **ووجد أن مظاهر الإصابة تكون للسلالة المأخوذة منها الحمض النووى، كما هو واضح من الجدول التالى:**

نـــوع الســـــلالـــة			مظاهر الإصابة
VIRUS	**RNA**	**Protein** بروتين	**Symptoms**
فيروس موزايك الدخان	TMV	TMV سلالة HR	مظاهر الإصابة لفيروس موزايك الدخان
موزايك الدخان + HR	TMV	موزايك الدخان TMV	مظاهرة الإصابة لفيروس موزايك الدخان TMV
سلالة TMV + HR	HR		مظاهر الإصابة لفيروس سلالة HR

وهذا يبين – ولأول مرة – أن حمض RNA هو الحامل الأساسى للمعلومات الوراثية لجزئ فيروس موزايك الدخان والمدخل المعروف فى النبات أن النواة أو النوية بها DNA، وهو الذى يوجه الخلية لإنتاج mRNA وبالتالى فإن الـmRNA مع وجود الريبوسومات Ribosomes الموجودة فى السيتوبلازم تكون البروتين فى خطوات متعددة، فهل يتبع تكون الفيروس هذا الطريق أو على النقيض للفيروس طريقه الخاص فى إنتاج جيله؟

وكان البحاث الأوائل لا يفرقون بين طريقة تكاثر الفيروس وتكاثر أى ميكروب آخر؛ حيث إن العملية ترجع إلى جزئ الفيروس نفسه الذى يعطى خلفه له، وتنتهى آخر خطوات الإنتاج Reproduction فى انقسام طولى أو عرضى يتبعه النمو ثم النضج. ولكن عند اكتشاف وجود جزئيات فيروسية لفيروس موزايك الدخان TMV أقصر فى طولها من طول الجزيئات العادية ٣٠٠ ملليميكرون Bawden & Pirie, 1953 فى أنسجة مصابة بالفيروس، ارتفعت عدة أسئلة منها هل هذه الجزيئات ممرضة، أو هل هى جزيئات غير ممرضة، إلا أن Takahashi & Rowlines, 1949 وجد أن هذه الجزئيات القصيرة غير ممرضة، وأن صفة العدوى تحملها الجزيئات الطويلة، ومن الممكن أن تنجح الجزيئات القصيرة فى تكوين جزيئات أطول إلا أنها لا يمكنها إحداث العدوى.

وبالتقدم العملى أمكن الوصول إلى أن بروتين الفيروس وحمض النواة يتكونان بنظامين منفصلين، ثم يلتصقان ليكونا جزئ النيوكليوبروتين الثابت.. **وهذه النظرية وضعت على أساس ثلاثة اكتشافات:**

أولا: أن البروتين يتكون تلقائيًا Donovo داخل الخلايا المصابة بالفيروس - وهذا عمل (Takahashi & Ishil 1952, Commaner et al 1953, Jenner and Iomoine 1953).

ثانيًا: يتخلص الفيروس من البروتين أى يبقى حمض النواة عاريًا، ويحمل صفة العدوى أن نتيجة العدوى به هى تكوين جزيئات كاملة من الفيروس تتكون من نيوكليوبروتين، وهذا عمل (Gierer & Schramm 1950, Frankel Conrat & Singer 1957).

ثالثًا: من الممكن تكوين جزيئات فيروسية ثابتة حاملة لصفة العدوى تشبه الفيروس الأصلى، وذلك فى مخلوط Suspension من بروتين الفيروس وحمض النواة فى العصير أبحاث (Frankel - Conrat & Williams 1955).

ومما سبق يمكن الإجابة عن السؤالين التاليين:

١ - هل يؤثرا الفيروس ويغير التأثير الوراثى لحمض DNA، ويجعله يعمل RNA غريبًا، أو

يعطى المواد اللازمة مثل النواة والإنزيمات... وهل يعمل RNA الفيروس كقالب لنفسه As its own templete؟

٢ - كيف يشارك RNA الخلية فى إنتاج شيء غريب عنه مثل بروتين الفيروس؟

وللإجابة عن هذه الأسئلة:

نعرف أن الإصابة الفيروسية إصابة جرحية؛ أى لابد من العمل على إدخال الفيروس داخل النبات، وبعد ذلك يبدأ الفيروس فى اتصال وثيق فى وحدة مع محتويات الخلايا الحية، بحيث لا يؤثر غسيل النسيج بالماء على هذه الوحدة، ولا يقلل الإصابة إذ وجد أنه عند حقن أوراق N.glutinosa بواسطة حمض RNA لفيروس موزايك الدخان، ثم غمسها فى محلول إنزيم RNA ase كاف لإبادة RNA، ولم يلاحظ أى تأثير على عدد النقط المحلية المتكونة، وهذه الوحدة هى أول عملية كيميائية أو طبيعية يحدثها للفيروس، ويسمى هذا الطور عملية ادمصاص Adsorption، وهناك بعض الظواهر التى تدل على أنه ومباشرة وبمجرد ادمصاص أو دخول Penetration الفيروس الخلية، يزال جزء من بروتين الفيروس بوسيلة ما حتى يتكشف خيط حمض النواة.. وهناك من يعتقد أنه إذا لم يحدث هذا فإن الإصابة لا تتم... أما الطريقة التى يحدث بها فغير معروفة.. ولم يحصل على إنزيمات فى النبات تحدث مثل هذا التأثير.. وقد تمت عدة تجارب فى المعمل لفصل وحدات البروتين من حمض النواة لجزيئات الفيروس النقية بدأها Sreeni Vasaya & Pirie 1938.

أوضح Jeener 1957 أنه إذا تخلل infiltrated إنزيم RNA ase أوراقًا محقونة بالموزايك خلال ساعتين من الحقن، فإن الفيروس لا يتكاثر، وهذا يوضح أنه لابد من مرور ساعتين على الأقل ليتخلص حمض RNA من البروتين. وفى هذه المدة فإن الفيروس معرض لعمل الإنزيم. أما إذا بدأ الإنزيم عمله بعد ساعتين فإن حمض RNA المنفصل يحمى نفسه بتداخلها مع العائل أو بواسطة تكوين Polymerization ببروتين الفيروس.

وفى تجارب أخرى (Single et al 1957) وجد أنه بمجرد أن أصبحت مادة الـ RNA فى علاقة وطيدة مع موقع الإصابة فى الخلية، فإن المقاومة للاشعاع تزداد، وهذا يحتاج إلى ٢,٥

ـ ٥ ساعات حسب نوع الفيروس.

وفى تجارب أخرى ذكر Kassanis 1960, Frankel - Conrat et al, 1955 أن النقط المحلية تظهر أسرع عند حقن النبات بحمض RNA عن حقنها بالفيروس الكامل، ووجد Schramm 1959 أن مدة السكون أو الخسوف Latent period (١٠ ساعات) أقل فى حالة الإصابة بحمض RNA عنها فى حالة الإصابة بالفيروس كامل.

لوحظ نشاط غير عادى لنواة الخلية المصابة بفيروس موزايك الدخان، وذلك بعد ٤ – ٢٠ ساعة من الحقن، وفى حالة الإصابة فإن مواد قائمة فى الخلية تتحرك من النواة (بناء المواد الخاصة بالفيروس). ويقول بعض البحاث بأن أخر خطوة لتكاثر الفيروس تأخذ مكانها فى نواة الخلية، وليس بعيداً عنها فى السيتوبلازم، ووجد Schramm & Rottger أن بروتين الفيروس يمثل فى السيتوبلازم بحيث يرى فى أول الإصابة حول النواة، ثم يظهر بعد ذلك خلال الخلية، ولكن لم يلاحظ فى النواة أو الكلوروبلاستيدات. وقد فسرت هذه الخطوة السابقة بأن الفيروسات التى تحتوى على حمض DNA ، الذى يتجه بعد دخوله الخلية إلى النواة، ويسيطر على حمض DNA النواة، ويجعله ينتج RNA جديداً، يعمل على تكوين بروتين الفيروس.. أما فيروسات RNA فيختلف العمل فيها، إذ يعتقد أن RNA الحمض المعدى أو على الأقل جزء منه يعمل كمرسل RNA يتجه مباشرة إلى الريبوسوم، وهناك يبدأ فى توجيه إنتاج الإنزيمات اللازمة لتكوين بروتين الفيروس.

وهناك رأى آخر يذكر أنه بمجرد تحرر الحامض النووى RNA من غلافه فإنه يدخل نواة الخلية؛ حيث يعمل هناك كقالب يتكون عليه خيط آخر يشبه له، ونتيجة لذلك يتكون شكل ذو خيطين: أحدهما RNA الأصلى للفيروس، والثانى هو الذى تكون جديداً، وبمجرد تكوين الخيطين ينفصلان ويعمل الخيط الجديد فى هذه الحالة كقالب، تتكون عليه خيوط جديدة تنفصل عنه بمجرد تكوينها، وتترك النواة متجهة إلى السيتوبلازم حيث يتم تمثيل البروتين الفيروسى.

وفى كلتا الحالتين تبدأ الخلية بتكوين بروتين وحمض النواة اللازمين لتكوين جزيئات فيروسية جديدة.. وقد أوضح Schramm et al. 1959 أن سرعة تكوين وحدات البروتين

تزيد بمقدار ٢٠٠٠ مرة سرعة تكوين حمض RNA، وربما يتحد المحتويان المكونان للفيروس داخل الخلايا.. كما تمكن Frankel - Conrat 1960 من اتحادهما فى العصير، وباختصار فإن زيادة تكوين البروتين يؤدى إلى تراكم بعضه فى الخلية.

وقد وجد Markham et al, 1948 فى تحضيرات الموزايك الأصفر للفت نوعًا آخر من البروتين، كما وجده أيضًا Takahashi and Ishil 1952 فى تحضيرات موزايك الدخان، ويسمى هذا البروتين X protein حسب Takahashi، أو أنتيجن ذائب Soluble antigen حسب عمل Jeenier 1952، أو بروتين B ذائب حسب Commoner 1956، ويمكن معرفته بواسطة طريقة Auchter Iony´s gell diffussion؛ إذ إن البروتين أصغر من الفيروس، فينتشر أسرع ويقابل الأجسام المضادة، ويتحد معها فى مكان بعيد عن مكان اتحاد الفيروس الأقل سرعة منه.. ولهذا البروتين خواص طبيعية تختلف عن بروتين الفيروس؛ فهو لا يحتوى على حمض نواة، ولا يمكن إحداث العدوى، وليس للعائل أى تأثير على إنتاجه فيختلف باختلاف سلالات الفيروس، فنجد جزيئات Rod Shaped مثل الـ TMV بأطوال مختلفة وبإعداد لا تشابه جزيئات الفيروس، وعند بنائها Reconstitution مع تحضيرات فيروس ذات صفة عدوى عالية، تتكون جزيئات بطول ٣٠٠ ملليميكرون، وتظهر لهذه الجزيئات صفة عدوى كالفيروس الأصلى وربما أعلى.

دورة فى تمثيل الفيروس:

كتب Bawden يقول إن المستخلصات المأخوذة من نباتات مصابة أو حيوانات مصابة دائمًا ما تحتوى على جزيئات مختلفة، ولا يميزها شكل واحد، يدل على أنها ناتجة عن تكرار للجزيئات نفسها التى أحدثت العدوى.. وتختلف هذه الجزيئات من جزىء لجزىء فى عدة أوجه فليست كل الجزيئات التى لها صفة العدوى متشابهة، ربما ذلك لاختلافات وراثية ناتجة عن طفرات واختلافات فى ترتيب العوامل الوراثية.

أما الجزيئات التى لاتحمل صفة العدوى، والتى تسمى بأسماء مختلفة، منها الانتيجن الذائب Soluble antigen أو الفيروس غير الكامل incomplete Virus أيضًا ذات أشكال مختلفة بعضها يحتوى حمض نواة، وبعضها له الحجم نفسه، والشكل، إلا أنها قد تكون

لها صفة العدوى مرة واحدة عند حقنها، وإذا كانت لا تسبب العدوى يكون ذلك نتيجة لتغيرات تشبه ما يحدث فى الأجسام الراقية، والذى يسمى Latent mutants وبعضها حمض نواة قصير أقصر من حمض النواة بالجزيئات التى تسبب العدوى، ومن هذا يتبين أنه لابد من وجود كمية معينة من الحمض؛ حتى يصبح الجزئ قادراً على العدوى، وبعض هذه الجزيئات لا يحتوى على حمض النواة، رغم أنها فى الحجم نفسه وشكل الجزيئات الفيروسية المعدية.

وقد نسأل ما الذى يدعو إلى تكوين مثل هذه الجزيئات المختلفة؟ ومن الصعب الإجابة عن هذا السؤال، إلا أنه ربما يمثل بعضها خطوات فى تكوين الفيروس، وربما يمثل البعض أخطاء فى عملية تمثيل الفيروس، ويرى البعض أنها ربما يكون محتويات متخلفة من العملية.

وقد أظهرت الدراسة الكيميائية لتضاعف الفيروس الآتى:

١ - وجود بعض الفسفور الفيروسى منتشراً فى سيتوبلازم الخلايا... وهذا يدل على انفصال بعض أجزاء الفيروس بمجرد دخوله الخلية.

٢ - إن حامض الريبونيوكليك الفيروسى يتكون من مصدرين فقط بعض مشتملات الفيروس الأصلى، وما تمصه الخلية من مواد ومن الوسط الذى تعيش فيه تحيلها بدورها إلى مواد فيروسية، أى أنه لا يشترك فى تكوينه حامض النيوكليك من سيتوبلازم الخلية أو نواتها، كما يحدث فى البكتريوفاج وبعض فيروسات أخرى.

٣ - لوحظ أنه إذا حقنت ورقة نبات دخان مصابة بفيروس الموزايك بمحلول كلوريد الأمونيوم، الذى يشمل ذرة النيتروجين على حالة النظير (١٥ن) فإن حامض الريبونيوكليك والبروتين الفيروسى اللذين يتكونان بعد ذلك يحتويان هذا النظير، قبل أن يوجد فى بروتين النبات نفسه؛ مما يدل على أن جهاز الخلية استطاع أن يدخل النيتروجين المشع فى مواد الفيروس مباشرة.

٤ - لاحظ Takahashi and Ishil أن هناك نوعين من الأجسام الفيروسية المستخلصة من

ورقة مصابة: أجسام أخرى وزنها الجزئى اصغر من الوزن الجزئى للفيروس، ولكن لها نفس الصفات السيرولوجية وهى مكونة من البروتين، فقد حامض الريبونيوكليك، علاوة على أنها غير قادرة على إحداث العدوى، وسميت بروتين (X).. وقد اقترح أن هذا طوراً ثابتًا فى تمثيل فيروس موزايك الدخان، واقترح أن تضاعف الفيروس TMV فى النبات لا يكون بالانقسام، ولكن باتحاد الـ RNA والبروتين اللذين يتكونان منفردين أولاً.

وقد كتب Sigel, M.M. & Baslay 1965 مقترحين المراحل الآتية لإصابة الفيروس للخلية:

١ - **المرحلة الأولى**: مرحلة الادمصاص Adsorption وفيها تجذب الخلية الفيروس إليها ويلتصق بسطحها. **وتتم هذه العملية على خطوتين:**

الخطوة الأولى: وتسمى elution، وفيها يمكن فصل الفيروس عن سطح الخلية.

الخطوة الثانية: وتسمى irreversalbe union، وفيها يكون الالتصاق ثابتًا، وليس من السهل فصل الفيروس عن الخلية.

٢ - **المرحلة الثانية**: Penetration step وتبدأ بدخول الفيروس الخلية، ويأتى هذا بعدة طرق منها أن تبتلع بعض الخلايا الفيروس Swallowed، أو قد توجد أعضاء خاصة Spe-cialized instrument of penetration تعمل على إدخال الفيروس فى الخلية، كما هو الحال فى فيروس البكتريا، وهذه المرحلة بتخلص الفيروس من غلافه البروتينى إما قبل دخوله الخلية كما هو الحال فى فيروس البكتريا، أو قد تبدأ عملية التخلص قبل الدخول، وتنتهى بعد الدخول عادة.

٣ - **المرحلة الثالثة**: Eclipse or dark period وهى مرحلة الخسوف أو المرحلة المظلمة، وفيها يستعد حمض النواة لقلب نظام العمل فى الخلية، وللسيطرة على نظام وميتابولزم الخلية، ويجبر الخلية على نظام خاص جديد لإنتاج إنزيمات وبروتينات لازمة لتكوين جزيئاته الجديدة.. وبذلك تبدأ الخلية فى إنتاج بروتين وحمض ونواة غريبة عن احتياجاتها.

٤ - المرحلة الرابعة Production of procursors وفيها تنتج الجزيئات الفيروسية الكاملة.

٥ - المرحلة الخامسة Release step: وفيها يخرج الفيروس من الخلية ويسلك طريقين، فإما أن يخرج الفيروس من الخلية جزيئًا بعد جزئ، أو قد تنفجر الخلية ويخرج الفيروس كما هو الحال فى فيروس البكتريا.

انتشار الفيروس:

بعد دخول الفيروس الخلية نتيجة للحقن وتضاعفه فيها، تغزو الجزيئات الفيروسية المعدية الخلايا المجاورة عن طريق الخيوط البروتوبلازمية Protoplasmic strands التى تربط جميع خلايا الورقة ببعضها، وسرعة الانتشار هذه غير كبيرة، وتقاس بالميكرون فى الساعة، وقد وجد Uppel 1934 أن فيروس TMV ينتقل من خلية إلى أخرى بسرعة ٧-٨ ميكرون س.

ولقد وجد Sammuel أن موزايك الدخان لم ينتقل من أوراق الطماطم المحقونة لمدة ٣-٤ أيام، كما وجد Kunkel أن فيروس البطاطس X يحتاج ٢-٣ أيام؛ لينتقل من مكان الحقن فى الأوراق إلى الساق، بينما يحتاج فيروس Tomato aucuba Mosaic إلى ستة أيام، وتستمر حركة الفيرس ببطء إلى أن تصل إلى اللحاء، فيسرع فى حركته وينتشر بسرعة إلى مسافات بعيدة فى الساق والجذور والقمة النامية، وتختلف السرعة باختلاف الفيروس واختلاف العائل.. ولقد وجد الفيروس فى الجذور، فى خلال ١٢ ساعة من أول ظهوره فى اعناق الأوراق المحفوظة، ووجد فى قمة الساق فى خلال يوم واحد ويتحرك فيروس تجعد قمة بنجر السكر بسرعة ١٥٢ سم/ ساعة، ولكن بسرعة ١,٢٧ سم/ ساعة فى الدخان، ويكون النسيج البرانشيمى Paranchyma هو مكان الحركة البطيئة للفيروس، وتصاب الأوراق الحديثة أولاً تليها الأوراق الأكبر سنا، وتبدأ إصابة الأوراق بجوار العروق الأكبر سنًا، وتبدأ إصابة الأوراق بجوار العروق، ويحتاج النبات المتوسط العمر إلى ثلاثة اسابيع ليصبح مصابًا كلية، بينما تحتاج النباتات المسنة إلى شهرين فى طور الإثمار.

ولقد وجد Coukhov and Kepitza أنه عندما يصل الفيروس إلى اللحاء تتغير السرعة، فبدخول فيروس موزايك الدخان اللحاء، وجد أنه ينتقل فى نبات الدخان بسرعة ١ - ١,١

سم/ ساعة فى الأوراق، بينما وجد Kunkel أن الفيروس يسير بسرعة ١٧ سم/ ساعة فى الساق.

ولا تعتمد حركة الفيروس السريعة على استمرار تكاثره؛ حيث إن اجزاء النبات البعيدة يوجد بها الفيروس فى الوقت، الذى تخلو منه بعض الأجزاء القريبة من مكان العدوى.

ويقترح Samuel أن هذه الحركة السريعة تحدث فى اللحاء، وتصحب حركة انتقال الغذاء من الأوراق، كما يقترح كثير من البحاث أنه الاتجاه نفسه الذى تسير فيه نواتج التمثيل الضوئى، ويدللون على ذلك بسرعة إصابة البراعم الزهرية والثمار، وكذلك عند وضع النبات فى الظلام أو عند نزع أوراق منه.. فإن هذا يزيد من سرعة انتقال الفيروس نحو القمة، ويؤكد ذلك تجارب علام ١٩٦٠، إذ وجد أن تركيز فيروس موزايك الدخان يزداد فى اعضاء نباتات الدخان بتقدمها فى العمر حتى يصل نهايته عندما يصل العضو إلى تمام النضج، كذلك لوحظت زيادة تركيز الفيروس فى الساق أثناء فترة الازهار، فى الوقت الذى يزداد نشاط المواد الغذائية المجهزة نحو البراعم الزهرية. ولفيروس موزايك الدخان القدرة على الحركة خلال الأوعية الخشبية، ولكنه لا ينتقل منه إلى الأنسجة الأخرى، إذا لم يجرح الخشب، ويتحرك فيروس تقزم البرسيم الذى عادة ما يوجد فى الأوعية الخشبية فى نبات Alfalfa.

ثانيًا الظروف الفسيولوجية لتضاعف الفيروس:

Physiological conditions for virus production

تحدد حالة العائل الفسيولوجية سرعة تزايد الفيروس لدرجة ملحوظة، وذلك بناء على أن الفيروس يتطفل إجباريًا داخل الخلية.. وحيث إن الفيروس نيوكليوبروتين لذلك فإن نموه وتزايده يتوقف أولاً على تبادل تمثيل البروتين وحمض النواة فى النبات العائل..

والعوامل الآتية لها تأثير كبير على تضاعف الفيروس:

١- تأثير التغذية بالعناصر المختلفة (ن- فو - بو) على تزايد الفيروس:

أ- التغذية الأزوتية (ن):

اختلاف الأزوت فى تغذية النبات يغير من سرعة تجمع الفيروس فيه؛ فمثلاً إذا ما زرعت

نباتات طماطم فى مزارع رملية بها نقص فى مصدر الأزوت (٣-٧ أجزاء فى المليون) ومزارع رملية بهما تغذية أزوتية عادية (٧٠ جزءاً فى المليون) وأخرى بها تغذية زائدة (٥٠٠ - ١٠٠٠٠٠ جزء من المليون)، واستمرت النباتات لمدة ٢٨ يوماً، قبل إصابتها بفيروس موزايك الدخان ولمدة ٣٠ يوماً بعد عملية الإصابة، لوحظت الاختلافات التالية: فى حالة التغذية العادية وصل النبات إلى حجمه الطبيعى، وفى حالة التغذية غير الكافية والتغذية الزائدة كان حجم النبات أصغر من المعتاد كثيراً.

وكان مقدار نيوكليوبروتين الفيروس مقاساً بالمليجرام لكل وزن طازج فى حالة الجوع الأزوتى ٣٤٪ أقل، وفى حالة زيادة الآزوت ٥٠٪ أكثر مما فى حالة النباتات التى حصلت على كمية معتدلة من الآزوت Kendrich and Others 1953.

وبناء على نتائج هذه التجارب وكذلك النتائج الأخرى، يمكن القول بأنه لا توجد علاقة مباشرة واضحة بين سرعة نمو النبات العائل وتجمع الفيروس فيه.. ففى حالة زيادة التغذية الآزوتية، يتعطل أو يوقف نمو النبات إلا أنه يزيد من انتاج الفيروس. أما السؤال عن ما هى المحتويات الآزوتية التى تذهب لبناء جزيئات الفيروس.. فهذا للآن لم يجد الإجابة الكاملة، إلا أن النتائج الموجودة تدل بوضوح على أن بروتين الفيروس لا يتكون من البروتين الجاهز بالنبات العائل، ولكن من جزيئات يعتقد أنها اتحاد لأحماض أمينية.

ب - التغذية الفوسفورية (فو):

وجد أن نباتات الدخان يزداد حجمها بزيادة نسبة المحتويات الفوسفورية فى المخلوط المغذى (٣ أجزاء فى المليون إلى ٢٣٧ جزءاً فى المليون). أما فى حالة المستويات العالية فإن حجم النبات يقل وتصبح النباتات قزمية، إلا أن تركيز الفيروس فيها يكون عالياً، فمثلاً عند ٥٤٧ جزء فوسفور فى المليون، كان تركيز الفيروس أكثر من تركيزه عند مستوى ٢٣٧ جزء فوسفور فى المليون، حيث كان نمو النبات أكبر.

فى حالة موزايك الدخان فإن الفوسفور غير العضوى يقل فى الأوراق، ابتداء من اليوم السادس بعد الحقن، كما وجد أن مقدار الفوسفور الذائب فى الأثير يزداد فى الساعات

الأولى بعد الحقن، ثم يقل بعد يومين إلى اليوم الرابع، وعندما تبدأ مظاهر الإصابة الخارجية في الظهور، تزداد كمية الفوسفور الذائب في الأثير.

جـ – التغذية البوتاسية :

وجد أن تغيير المحتويات البوتاسية في المخلوط المغذى ذو تأثير ضعيف على نمو النبات وتجميع فيروس موزايك الدخان. أما في حالة زراعة النباتات في محاليل مغذية متوازنة، فإن تجميع الفيروس فيها يكون في علاقة متوازية مع نموها وحجمها.

٢ – تأثير التغذية بالعناصر المختلفة على الإصابة الفيروسية :

في تجارب المزارع المائية التي أجريت بكلية الزراعة جامعة عين شمس، وجد علام وآخرون ١٩٧٥ اختلافًا في استجابة نباتات الدخان للإصابة بفيروس الموزيك حسب نوع المحلول الغذائي المستخدم (محلول هوجلاند)، فقد أدى المحلول الغذائي ذو التركيز المتخفض من النيتروجين (٥٠ جزء/ مليون)، أو الذي ينقصه البوتاسيوم أو الكبريت إلى تقليل تأثير الإصابة بالفيروس على نمو النباتات، بينما كان التأثير في حالة نقص الكالسيوم والمغنسيوم من المحلول الغذائي متوسطًا، في حين أن تأثير الإصابة بالفيروس على نمو نباتات الدخان كان شديدًا في حالة استخدام محلول غذائي، ذي تركيز منخفض من الفوسفور (١٠ أجزاء/ المليون) أو الحديد أو المنجنيز.

٣ – الكربوهيدرات :

للكربوهيدرات تأثير كبير في إنتاج الفيروس لتدخلها في تمثيل الأحماض الأمينية والأحماض النووية وارتباطها بعملية التنفس.. ولقد وجد سوخوف عام ١٩٥٠ أنه في حالة ما إذا نزعت أوراق دخان مصابة بفيروس الموزايك، وحفظت في ظلام، يقل تراكم الفيروس فيها بشكل ملحوظ. وفي حالة ما إذا تعرضت نصف هذه الأوراق إلى إدخال محلول ٢٪ جلوكوز في مسامها «بطريقة التفريغ»، يلاحظ نمو الفيروس بكثرة عن نموه في النصف الآخر الموضوع في ماء مقطر.

كما وجد Fulton (1952) أن فيروس نيكروزيس الدخان لا يسبب نيكروزيس لأوراق

الفاصوليا المنزرعة والمحفوظة فى الظلام، بينما إذا ما وضعت هذه الأوراق على محلول ١٪ آجار يحتوى على ٤٪ جلوكوز، و٠,٠٤٪ فوسفات البوتاسيوم KH_2Po_4 يظهر النيكروزيس بوضوح. وظهرت أهمية المواد الغذائية المتجمعة فى الفلقات لإنتاج الفيروس فى حالة إصابة بادرات الطماطم بفيروس الدخان؛ فإذا نزعت الفلقات فى بعض النباتات، ثم حقنت وحفظت البادرات فى الظلام.. فإن تجمع الفيروس يقل بكثرة فى النباتات المنزوعة الفلقات عنه فى النباتات غير منزوعة الفلقات.

ووجد سوخوف ١٩٥٠ أيضًا أن التمثيل يؤثر على قابلية النباتات للإصابة بالفيروس فعدد النقط الميتة (نيكروزيس) التى تظهر على أوراق الفاصوليا وأوراق N.glutinosa ونباتات الدخان نتيجة لإصابتها بفيروس نيكروزيس الدخان وفيروس موزايك الدخان وموزايك البرسيم وموزايك اللفت تتوقف على الساعة، التى تمت فيها عملية الحقن فيقل عددها فى الأوراق التى أصيبت الساعة ٤–٦ صباحًا، ويزداد فى التى أصيبت ٨–١٠ صباحًا، ثم يصل النهاية العظمى فى حالة الإصابة الساعة ١–٢ بعد الظهر، ثم تقل ثانية كلما تأخرت حتى الصباح.

٤ – الحرارة:

تلعب الحرارة دورًا كبيرًا فى حياة الفيروس داخل العائل فتوقف سرعة تكاثر الفيروس فى خلايا النبات، يعتمد بدرجة كبيرة على درجة الحرارة المحيطة بالنبات، كما تتوقف مقاومة الفيروس للحرارة على ظروف زراعة النبات العائل.

ويمكن لبعض الفيروسات أن تتحمل درجات حرارة عالية، لا تتحملها إذا ما وجدت فى العصير خارج العائل. ويفسر ذلك بأنه نتيجة لارتفاع الحرارة، بينما تتجمع مواد مضادة كانت تؤثر على الفيروس فى المجالات الأخرى بحيث تسبب وقف تكاثره. وكتب كثير من البحاث عن حالات كثيرة لفساد الفيروس؛ نتيجة لتعرض الأجزاء النباتية المحتوية عليه للحرارة. فمثلاً يفسد فيروس Sereh قصب السكر عند غمر العقل المصابة لمدة ساعة فى ماء حرارته ٥٠°م، كذلك فيروسات الاصفرار والنقط الحمراء وتورد الخوخ تفسد بحفظ الأشجار المريضة لمدة اسبوعين على ٣٠°م، كما وجد أن الفيروس يفسد أسرع عند وجوده فى المجموع

الخضرى، عنه إذا ما وجد فى الجذور. فشتلات الخوخ المصابة بالإصفرار يفسد فيها الفيروس كلية إذا ما حفظت مدة ٤٠ دقيقة على حرارة ٤٢ْم، أو ٤ دقائق على حرارة ٥٠ْم، وإذا حفظت درنات البطاطس المصابة بفيروس التفاف الأوراق لمدة ٢٥ يومًا على حرارة ٣٧,٥ْم.. فإن ذلك يؤدى إلى سلامة الدرنات.

٥ - الضوء:

الضوء كما أنه عامل مهم فى حياة النباتات الخضراء، فهو ذو تأثير كبير فى حياة الفيروس. ففى أوراق الدخان المحقونة والمحفوظة فى الظلام يتكاثر فيروس موزايك الدخان ببطء ملحوظ عنه فى حالة ما إذا حفظت هذه الأوراق فى الضوء العادى، كما وجد أن تعرض النباتات لفترات متقطعة للظلام ثم للضوء يشجع من إنتاج الفيروس. والجدول (٦ - ١) يبين ذلك:

(جدول ٦ - ١): تأثير تبادل الإضاءة والإظلام على إنتاج الفيروسى
(حسب سوخوف وكابيستزا ١٩٥٠)

ظروف التجربة	عدد النقط	متوسط النقط الميتة على نصف ورقة	علاقة العامل الأول إلى الثانى
٢ (يومان) فى الظلام ثم ٢ (يومان) فى الضوء	٢٥٩٤	٢٥٩٤	٣٤ر-
٣ (أيام) فى الضوء ثم ٢ (يومان) فى الظلام	٦٠٠٦	٦٠٠٦	١٠٠ر-

وحسب ما هو واضح فى الجدول السابق فإن متوسط عدد النقط الميتة حيث الظلام يليه الإضاءة، أما الاستمرار فى تعريض النباتات للضوء أو للظلام كان ذا تأثير واحد فى كلتا الحالتين، ويلاحظ أنه فى حالة ما إذا سبق الإظلام الإضاءة فإن التأثير يكون أقل. وذلك لأن الإظلام يزيد من قابلية إنتاج الفيروس، ويرجح أن السبب فى ذلك مرتبط بانحلال البروتين Hydrolysis فى الخلايا أثناء إظلامها، والذى يستعمله الفيروس لتمثيل بروتينه.

٦ - عمر النبات واتجاه التمثيل الغذائي:

يتوقف إنتاج الفيروس على عمر النبات وعمر أعضائه، وكذلك على مكان وجود الأنسجة في ورقة أو أخرى.. ولقد وجد علام Allam عام ١٩٦١ أن تركيز فيروس موزايك الدخان يختلف باختلاف أعضاء نبات الدخان واختلاف عمرها.

أ - ففي الأوراق يزداد تركيز الفيروس؛ حتى يصل إلى نهايته العظمى قبل دخول النبات في طور الأزهار مباشرة، وبعد ذلك ينخفض التركيز.

ب - في الجذور يزداد التركيز كلما كبر النبات، ويصل نهايته العظمى وقت الإزهار، ثم يبدأ في الانخفاض.

جـ - وكذلك يزداد التركيز في الساق حتى يصل نهايته العظمى وقت الإزهار، ثم يبدأ ثانية في الانخفاض.

د - يكون التركيز عاليًا في البراعم الزهرية لنبات الدخان قبل تفتحها، ثم يأخذ في الانخفاض عند تفتحها.

ويوضح الجدول (٦ - ٢) تركيز الفيروس في أجزاء النبات المختلفة، مقدراً بالطرق البيولوجية وبعد حقن النباتات بأسبوع ثم أسبوعيًا حتى نهاية الإزهار.

جدول (٦ - ٢): التركيز النسبي لفيروس موزيك الدخان في الأجزاء المختلفة لنبات الدخان، وحسب أعمارها المختلفة (علام ١٩٦١).

جزء النبات	متوسط تركيز الفـ وس مقدراً بطريقة النقط المحلية					
	بعد أسبوع من الحقن	بعد أسبوعين من الحقن	بعد ثلاثة أسابيع قبل خروج البراعم	بعد أربعة أسابيع قبل خروج البراعم	بعد خمسة أسابيع بداية الإزهار	بعد ستة أسابيع نهاية الإزهار
الأوراق	٣,٢	٥٧,٦	٢٥,٦	١١٥,٢	١١٥,٢	١٤٠,٨
الساق	١١,٢	١٧,٦	٣٨,٤	٤٦٠,٨	٦٧,٢	١٤,٤
الجذر	٥٧,٦	٧٦,٤	١٥٣,٦	٦١٤,٤	٥١,٢	٣٥,٢
الأزهار	-	-	-	٥١٢	٦٤	٢٥,٦

وعلاوة عما سبق يلاحظ من الجدول اختلاف تركيز الفيروس باختلاف الأعضاء، وأمكن تفسير زيادة تركيز الفيروس فى أجزاء النبات المختلفة بزيادة عمرها حتى يصل نهايته العظمى عند نضج هذه الأجزاء، وتكون زيادة تكاثر الفيروس نتيجة لزيادة بناء المواد الغذائية فى هذا السن.

أما انخفاض تركيز الفيروس فى هذه الاعضاء بدخولها طور الشيخوخة، فلا يمكن تفسيره بانتقاله من هذه الأعضاء إلى اعضاء أخرى، ولكن يمكن تفسيره بتغيير اتجاه ميتابوليزم الأعضاء فى سنها المتأخر، أو حدوث تغيير فى جزيئات الفيروس.

ولقد لاحظ Sadasivan, 1940 أنه فى حالة إصابة أوراق نبات الدخان بالتساوى بواسطة سلالة فيروس موزايك الدخان العادى، تكون أكبر كمية للفيروس فى الأجزاء الوسطى للورقة، ثم يقل تركيزه عند الاتجاه لقاعدة الورقة وأقل فى قمة الورقة.

ثالثًا: فسيولوجى النبات المصاب بالفيروس:

Physiology of virus diseased plant

حيث إن الفيروس متطفل إجباريًا داخل الخلايا.. فإنه يسبب إعمالاً غير مرغوبة لميتابوليزم النبات. ويؤدى تجمع جزيئات الفيروس بكثرة فى الخلايا إلى ضياع أهم مواد التمثيل الغذائى فى الخلية، والتى هى ضرورية للبناء الفيروس بصفته نيوكليوبروتين.

وتظهر أهمية الإصابة الفيروسية بالمثل الآتى، وهو أن كمية بروتين فيروس موزايك الدخان فى النبات المصاب تصل إلى ١٠٪ من وزنه الجاف.. وتسبب الفيروسات الشديدة فساداً كبيراً فى ميتابوليزم الخلية لدرجة موتها مسببة نيكروزيس.. وأمام هذه الحالة غالبًا ما يموت النبات.. وفى حالة الفيروسات المتوسطة القوة فإن النباتات المصابة تتحمل خسارة، وتكون الإصابة حادة Cronic، ويظل الفيروس داخل الخلايا حتى نهاية عمر النبات.

ولم يدرس فسيولوجى النبات المصاب دراسة وافية.. ويمكن الإضافة أيضًا أن هناك خلافات مميزة بين الفيروسات المختلفة وتأثيرها على الأجناس المختلفة من النباتات، ولهذا لايمكن ذكر قواعد عامة ثابتة فى هذا الموضوع، ولكننا سنتناول بعض التأثير على العمليات الحيوية فى النبات المصاب بقدر الإمكان.

أولاً : التنفس : Respiration

يمكن إعطاء امثلة منفردة لتأثير التنفس فى النباتات المصابة بأمراض فيروسية كالآتى : وجد Sastri 1936 أن نبات الصندل المصاب بتشوه الأوراق يحتاج إلى زيادة ٥٠٪ أكسجين عما فى حالة النبات السليم. كما وجد Grigsby 1938 أن ثانى أكسيد الكربون المتصاعد من أوراق المالينا المصابة بالموزايك يزيد بنسبة ٢١-٤٢٪ عن الكربون المتصاعد من الأوراق السليمة.. وفى حالة الأمراض الفيروسية تتوقف درجة تأثير تنفس النباتات على طور الإصابة، وكذلك العمر والوضع الفسيولوجى للنبات.

وكثيراً ما نقابل فى المراجع بنتائج عكسية لما سبق ذكره، فمثلاً وجد Gond 1928 زيادة نسبة التنفس فى أوراق البطاطس المصابة بفيروس تجعد الأوراق، بينما سجل Muller (1932), Kruger, and Pyervitch (1934) انخفاض التنفس. وهذه النتائج تتعارض حيث إن البحاث استعملوا فى تجاربهم نباتات من أصناف مختلفة متفاوتة العمر، وفى مناطق تختلف ظروفها الجوية. ومن المعتقد أن شدة الفيروس لم تكن واحدة فى كل التجارب.

بناء على ما سبق يمكن القول أن التغيير فى تبادل الغازات فى حالة أوراق البطاطس المصابة بالتجعد غير ثابت، ويمكن ألا يوجد فى حالة بعض الظروف. ومثل هذه النتائج المختلفة حصل عليها فى حالة تقدير نباتات مصابة بفيروس موزايك الدخان.

فلاحظ بعض البحاث مثل :

Daniel 1930, Glaston, 1942, and Lohr and Muller 1952, Koldvel زيادة فى تنفس النباتات المصابة، بينما لاحظ البعض الآخر انخفاض التنفس Mckleon 1957, (Lemmon 1953 وآخرون لم يلاحظوا اختلافاً فى تنفس النباتات المصابة عن تنفس النباتات السليمة.

كل هذا يعطى أساساً للاقتراح بأن عملية التنفس فى حالة بعض أمراض النباتات الفيروسية لا يحدث لها تغيير ملموس، وإذا ما حصلت تغيرات فإنها غير مؤكدة، وليست دليلاً على بداية الإصابة.

وإذا ما نظرنا للتنفس على أنه بداية القوة energy الضرورية لتمثيل كل النيوكليوبروتين المتكون فى الخلايا بالمصابة، فإنه ليس من الضرورى وجود الزيادة الملحوظة لمستوى التنفس فى الخلايا المصابة؛ حيث إن البروتين فى كلتا الحالتين واحد تقريبًا، إذ يكون تجمع الفيروس على حساب نيوكليوبروتين الخلايا الذى تقل كميته، ولكن الكمية العامة للنيوكليوبروتين تظل ثابتة نسبيًا، ورغم أنه فى بداية الإصابة فإن تمثيل النيوكليوبروتين ومستوى التنفس دائمًا ما يرتفع.

ثانيًا: الإنزيمات المؤكسدة: Oxidative enzymes

لاحظ Woods (1899) زيادة ملحوظة فى عمل إنزيم الأكسديز فى نباتات الدخان المصابة بالموزايك. كما وجد Kokin (1937) أنه فى حالة وجود هذا المرض يزداد نشاط البيروأكسيديز. ولاحظ هذا أيضًا Bunzel (1913) فى حالة إصابة بنجر السكر بفيروس تجعد القمة. ولاحظ Oparin (1929) هذا فى حالة موزايك بنجر السكر، كما لوحظ أيضًا فى حالة فيروس تجعد أوراق البطاطس وفيروس برونز الطماطم.

ويزيد نشاط إنزيمات التحلل المائى فى حالة الدخان Vager (1955) وموزايك تجعد أوراق البطاطس Kyprevitch (1947) ويقل نشاط الكتاليز فى حالة الأمراض الفيروسية، وهذا واضح فى أمراض موزايك الدخان والطماطم وموزايك البطاطس.

ثالثًا: التمثيل الضوئى: Photosynthesis

فى حالة كثير من الأمراض الفيروسية، تقل كمية الكلورفيل فى البلاستيدات الخضراء، ولهذا تظهر مظاهر الموزايك والكلوروفيل العام، ففى حالة إصابة نباتات الدخان بالموزايك يقل الكلوروفيل بنسبة ٢٥-٥٥٪ حسب السلالة المسببة.

ووجد علام وآخرون سنة ١٩٧٤ نقص محتوى الكلوروفيل الكلى لنباتات الدخان المصابة بفيروس موزايك الدخان، ولا سيما فى الأصناف الشديدة الحساسية للإصابة بهذا الفيروس، ويتضح ذلك من الجدول (٦ – ٣):

جدول (٦ - ٣) : ٪ للمحتوى الكلوروفيللى فى أصناف مختلفة

من الدخان أصيبت بفيروس موزايك الدخان.

المعاملة	الأصناف					
	Hicks	N.C. 95	Harison	White gold	Kuntaky	Burley
سليم	٠,١٣	٠,١٣	٠,١٤	٠,١٤	٠,١٠	٠,١٢
مصاب	٠,٠٦	٠,٠٥	٠,٠٩	٠,٠٨	٠,١٠	٠,١٢

وفى حالة تجعد البطاطس تقل كمية الكلوروفيل فى أوراق متوسطة العمر بنسبة ٢٤-٣٦٪، وتنخفض قوة التمثيل الضوئى بنسبة ٣٠٪ فى المتوسط. وفى حالة الموزايك فى البطاطس يمكن أن تنخفض قوة التمثيل الضوئى إلى ٣٠٪.

رابعًا: تمثيل الكربوهيدرات : Carbon assimilation

يحدث تغير لعملية تمثيل الكربوهيدرات فى حالة إصابة النبات بالفيروس، فمثلاً تنخفض كمية الكربوايدرات فى الأوراق المصابة بالموزايك، بينما تزداد فى حالة إصابتها بالاصفرار. وتنتمى للموزايك أمراض موزايك الدخان وموزايك البطاطس وموزايك الخيار، وتنتمى للاصفرار أمراض التفاف أوراق البطاطس، وستلبور العائلة الباذنجانية، اصفرار بنجر السكر، تجعد الشعير، موزايك القمح الشتوى، وكثير من الأمراض الأخرى.

فى الخطوات الأولى لإصابة أوراق نباتات الدخان بفيروس موزايك الدخان، فإن تأثير الفيروس يلاحظ فى الكربوأيدراتات أولاً وبالأخص فى النشا الذي يكشف عنه بواسطة اليود، باستمرار المرض فى تقدمه يلاحظ قلة كمية الكربوأيدرات فى الأوراق المصابة عن كميتها فى أوراق النباتات السليمة. ويؤدى موزايك بنجر السكر إلى انخفاض كمية السكر فى ثماره الجذرية. لوحظ فى تجعد أوراق البطاطس، وتجعد الحبوب وستلبور العائلة الباذنجانية، واصفرار بنجر السكر.

وربما يكون سبب تجمع الكربوأيدرات فى أوراق النباتات المصابة بالاصفرار، هو عدم

انتقالها إلى الأجزاء الأخرى، وكذلك قلة استعمال الأوراق لها، وطبيعى أن يرتبط عدم انتقال الكربوايدرتات إلى الأجزاء الأخرى من النبات بتوقف وظيفة اللحاء؛ إذ يلاحظ وجود نيكروزيس فى لحاء النباتات المصابة بفيروس تجعد أوراق البطاطس أو فيروس تجعد الحبوب.. أما فى حالة الإصابة بفيروس ستلبور الطماطم، فإنه لا يلاحظ نيكروزيس، ولكن يلاحظ تغير تشريحى فى أنسجة اللحاء.

خامساً: تمثيل الأزوت : Nitrogen assimilation

وجد أنه فى حالة تجميع جزيئات فيروس الموزايك فى أوراق نبات الدخان المنفصلة يظل مستوى البروتين الآزوتى دون تغيير رغم ما يحدث للبروتين من تحلل مائى. وفى حالة تجمع الفيروس فى النباتات التى تحصل على تغذية جيدة، لوحظت زيادة فى كمية البروتين الأزوتى عما هو فى نباتات المقارنة، كما تظل فاعلية إنزيم البروتينيز كما هى دون تغيير.

ووجد علام وآخرون أن المحتوى النسبى من النيتروجين الكلى قد ازداد فى انسجة أوراق وساق وجذور نباتات الدخان، نتيجة للعدوى الصناعية بفيروس موزايك الدخان حتى عمر مائة يوم، ولوحظت زيادة فى المحتوى النسبى للنتروجين الذائب نتيجة للعدوى الصناعية بالفيروس فى الفترة الأولى من حياة النبات، وتوقفت هذه الزيادة فى العمر الثانى من النبات، وعلى العكس من ذلك وجد هناك زيادة فى المحتوى النسبى من النتروجين غير الذائب، وكذلك النسبة بين النتروجين غير الذائب فى العمر الثانى من النبات.

يشكل نيوكليوبروتين الفيروس بحوالى ١٠٪ من الوزن الجاف للبروتين الذائب وغير الذائب لأوراق الدخان المصابة (حسب بودن وبيرى ١٩٤٦)، كما وجد Komner 1952 أن كمية الآزوت غير البروتينى تقل كميته فى النبات المصاب عنه فى النبات السليم.

وتتوقف العلاقة بين الكربون والآزوت C/N فى النباتات المصابة واختلافها عنها فى النباتات السليمة على سلوك المرض نفسه. ففى حالة أمراض الموزايك تقل هذه النسبة، أما فى حالة الاصفرار فتزيد النسبة، ويكون التغير فى كمية الكربوايدراتات فى النباتات المصابة العامل الأساسى فى اختلاف النسبة، رغم أنه مرض تجعد الحبوب Striate يحدث بجانب

الزيادة فى كمية الكربوايدراتات فى الأوراق انخفاض فى البروتين الآزوتى.

وفى حالة موزايك الدخان تزداد الأحماض الأمينية الحرة فى الأنسجة، وبالأخص أحماض الأسبرجين، فبتحليل المستخلص الذائب للأوراق المصابة بالموزايك لوحظ على ورق الكروماتوجرافى أحماض هستدين، ليسين والاسبرجين التى لم تحفظ فى الأوراق السليمة.

سادساً: النتح: Transpiration

لم تدرس هذه الناحية الدراسة الكافية فى النباتات المصابة بالأمراض الفيروسية. لوحظ فساد واضح فى الاتزان المائى بنباتات البطاطس، والفلفل وأصناف كثير من الباذنجان المصابة بفيروس ستلبور؛ مما يؤدى إلى آثار باثولوجية حادة تنتهى بذبول وموت النباتات. وربما يرتبط سبب الذبول بإصابة المجموع الجذرى إلا أن هذا لم يدرس جيداً.

سجل كوبرفيتش (١٩٣٤) زيادة النتح فى حالة البطاطس المصابة بالموزايك، ووجد Kohin (1939) عكس ذلك فى حالة موزايك الدخان، كما وجد ذلك أيضاً كوبرفيتش (١٩٤٣) بالنسبة لتجعد أوراق البطاطس.

سابعاً: النمو: Growth

توقف النمو يظهر كأوضح وأهم مظهر إصابة لأمراض النباتات الفيروسية، وتسبب بعض الفيروسات ضعفاً كبيراً لنمو النبات. ومن هذه الفيروسات فيروس التجعد وفيروس الاصفرار فى البطاطس، وفيروسات أخرى وينتج قصر النبات عن نقص فى طول الخلايا، كما تقل فى نموها فمثلاً النموات الخيطية لدرنات البطاطس المصابة بفيروس ستلبور، تتكون من خلايا مختزلة حيث تظهر كميتها فى القطاع العرضى، أقل منها فى حالة النموات الناتجة من الدرنات السليمة، واختزال ويكون صغر حجم النبات المصاب نتيجة لفساد فسيولوجى عام، وكما يظهر فهو أقل ارتباطاً بالتغير فى المحتويات المنشطة للنمو.

الفصل الثانى

مظاهر الإصابة الفيروسية

Symptoms Of Virus Infection

يختلف تأثر النباتات بالإصابة بالفيروس من آثار بسيطة إلى موت سريع. والفيروسات متطفلة إجباريا، وإذا قتلت عوائلها فهى فى الوقت نفسه تحد من وجودها، إلا أنها تسبب أمراضاً مزمنة أكثر من تسببها لأمراض مميتة، فإذا انتشر الفيروس فى عائل مسبباً له الموت السريع، يكون فى الوقت نفسه له القدرة على إصابة عوائل أخرى لا يؤدى إلى موتها.

وعند دخول الفيروس الخلية النباتية يتضاعف فيها، وقد ينتشر داخل أعضاء النبات المختلفة، وتكون الإصابة نتيجة لذلك عامة Systemic infection تعطى مظاهر إصابة عامة بأجزاء النبات المختلفة Systemic Symptoms.

وقد يكون النبات حساسًا للفيروس (hypersensitive) تنحصر الإصابة فى منطقة دخولها، دون أن تنتشر إلى الأجزاء المختلفة من النبات، وتسمى فى هذه الحالة إصابة موضعية Local infection، تؤدى إلى مظاهر إصابة محلية Local Symptoms. وللإصابة الفيروسية أوجه عدة فقد يحدث فوراً، وبعد حدوث الإصابة وانقضاء فترة الخسوف Eclipse period ظهور حالة شديدة من المرض، وتسمى هذه بالوجه الحاد للإصابة Shock Phase or acute case، والتى أحياناً ما تؤدى إلى موت النبات، فتسمى إصابة مميتة Lethal infection، ولكن عادة ما يعيش النبات ويبدأ ظهور وجه آخر من أوجه الإصابة، وهو الوجه المزمن؛ أى إصابة مزمنة Chronic infection وفيه تظهر على الأجزاء الحديثة من النبات مظاهر إصابة أقل شدة مما ظهرت فى الوجه الحاد من الإصابة. وربما يحمل بعض الشفاء للنبات المصاب أو شفاء تام recovery، وقد يتبادل الطوران أو وجها الإصابة الوضع، وهذا واضح فى بعض أمراض الفاصوليا؛ إذ تظهر على بعض من الأوراق مظاهر حادة شديدة، ثم تخرج مجموعة أخرى من الأوراق مظاهر إصابة خفيفة و... هكذا.

ويمثل هذه الحالة أيضاً مظهر التبقع الحلقى Ringspot، وأحياناً لا تؤدى الإصابة الفيروسية إلى مظاهر إصابة مرئية، ويسمى هذا بغياب المظاهر الخارجية inapparency of symptoms، وكان جيمس جونسون عام ١٩٢٥ James Johnson أول من وجه النظر لهذه الظاهرة؛ إذ وجد الفيروس فى نباتات بطاطس شبه سليمة، ومنذ ذلك الوقت وأخذت قضية تخفى مظاهر الإصابة الخارجية انتباهًا خاصًا، خاصة لا رتباطها بالنباتات التى تتكاثر خضرياً وتعطى الشهادات certified seeds، وكذلك فلهذه الصفة أهمية بالنسبة للإصابة الفيروسية، فهى تمثل مشكلة عامة فى مقاومة هذه الأمراض؛ إذ إن مثل هذه النباتات التى تظهر سليمة تمثل نقطة انطلاق، تنتشر منها الإصابة إلى النباتات المجاورة القابلة للإصابة، سواء من النوع نفسه أو من أنواع نباتية أخرى. وتوجد فيروسات عديدة لها عوائل لا تظهر مظاهر خارجية نتيجة للإصابة، وقد يطلق على هذه الحالة الإصابة المتخفية (Latere = to lie hidden) Latency infect، وليس لهذه العوائل القابلة للإصابة حساسية معينة، ولكن لها قوة تأثير على الفيروس يجعلها لا تظهر تأثراً ظاهرياً للإصابة، وتسمى مثل هذه النباتات carrier hosts أى حاملة للإصابة، مثل فيروس الموزايك المتأخر للحامول Dodder Latent Mosaic V.، وفيروس القرنفل المتأخر .Carnation latent V. وربما وفى بعض الأحيان تختفى مظاهر الإصابة الخارجية لوقت ما، فتظهر الأجزاء النباتية المتكونة حديثاً خالية من المظاهر الخارجية. ولكن قد تعود المظاهر بعد وقت، وتسمى هذه الظاهرة بالتخفى masking، وغالبًا ما تسبب الظروف الجوية مثل الحرارة والضوء هذه الحالة، ومن أمثلتها: فيروس تقزم البرقوق .Prune Dwarf V؛ حيث يختفى المرض فى البرقوق الإيطالى إذا ما تعرض لحرارة أعلى من ١٣° م، وكذلك فيروس X البطاطس حيث تختفى مظاهر الإصابة فى الحرارة والضوء الشديد.

وإذا اختفى المرض بصفة دائمة فتسمى هذه الحالة شفاء recovery رغم وجود الفيروس بداخل النبات مثل فيروس التبقع الحلقى فى الدخان T. Ring Spot ويعبر عن هذه الحالة بالمناعة المكتسبة Acquire immunity، وغير معروف طبيعة هذه الحالة عن حالة Latency بوجود مظاهر الإصابة على الأجزاء القديمة المسنة من النبات.

وفى حالة الفيروسات التى تنتقل خلال البذور أو التقاوى (البطاطس والفاصوليا) يستعمل اصطلاح الإصابة الأولية Primary infection للإصابة التى تظهر مظاهرها فى موسم الإصابة نفسه، والإصابة الثانوية Secondary infection للإصابة الناتجة من زراعة بذور أو تقاوى مصابة.

فمثلاً فى حالة فيروس التفاف الأوراق فى البطاطس PLRV، فإن الإصابة الأولية هى التى تظهر مظاهر إصابتها فى الموسم نفسه، والإصابة الثانوية، أو الطور الثانوى هو ظهور الالتفاف على أوراق النباتات الناتجة من زراعة درنات مصابة.

وتنشأ أعراض الإصابة الفيروسية نتيجة لحدوث تغيرات فى التفاعلات الكيميائية الحيوية، التى تأخذ مجراها فى النبات، وذلك لوجود مجاميع كيميائية خاصة فى تركيب جزىء الفيروس، وتختلف الأعراض التى تحدثها الفيروسات باختلاف تلك المجاميع وعوائلها والظروف المحيطة.

وتسبب الإصابة الفيروسية وتنعكس على النباتات على هيئة تغيرات أو مظاهر خارجية، يمكن رؤيتها بالعين المجردة، وأخرى داخلية فى النباتات المصابة، من أهمها :

١ – تغيرات كيميائية Chemical Disorders .

٢ – تغيرات سيتولوجية وتشريحية Cytological & Anatomical Disorders .

٣ – وجود أجسام داخلية غريبة عن النبات Inclusion Bodies .

٤ – وجود جزيئات فيروسية تمثل الفيروس.

وسنتناول هذه المظاهر الناتجة عن الإصابة الفيروسية بشىء من التفصيل كالآتى:

أولاً : التغيرات الكيميائية : Chemical Disorders

كما سبق القول فإنه بدخول الفيروس إلى أنسجة النبات يسيطر على العمليات الكيميائية الحيوية التى تجرى ويسخر النبات أولاً لتخليق المواد التى يستخدمها فى مضاعفته، هذا بجانب أن **بعض الفيروسات تسبب تكوين محتويات داخلية وحدوث**

تغيرات كيميائية، قد تنعكس على هيئة مظاهر إصابة مرئية أو محسوسة، مثل:

١ - النقص فى محتوى الكلوروفيل والزيادة فى تركيز الكاروتين والاكزانثوفيل Xanthophylls التى تؤدى إلى تغير فى لون الأوراق، كما أنه بدراسة مقارنة نباتات الدخان وايت بيرلى White Burley المصابة بالموزايك والسليمة، وجدت زيادة فى حمض الماليك Malic acid، ونقص ملحوظ فى حمض Suxcinic acid، كذلك فإن زيادة تركيز صبغة الأنثوسيانين anthocyanins فى الخلايا ربما تتأثر نتيجة للإصابة الفيروسية، ويتبع هذا ظهور لون أحمر غير عادى، أو ألوان أرجوانية تظهر على الأوراق، أو على الأزهار. وكذلك فى حالة موت الأنسجة يظهر مركب قاتم من الميلانين dark - coloured melanins.

٢ - ويوجد تغير كيميائى له أهمية من الناحية التشخيصية، وهو إفراز المواد الشبيهة بالصمغ؛ Gummosis أى إفراز مواد بنية محمرة، وهذه مثلاً تعتبر مظهراً تشخيصيًّا (مميزاً) لمرض موزايك البرسيم الأبيض White clover mosaic ومرض القوباء فى الموالح.

٣ - ويوجد أيضاً تغير كيميائى معروف هو التجمع غير الطبيعى للنشا فى الأوراق، والذى ينشأ عنه زيادة سمك الورقة والتفافها، كما هو الحال بالنسبة لفيروس التفاف أوراق الكمثرى Pear leaf roll، وفيروس التفاف أوراق البطاطس PLRV، وفيروس اصفرار بنجر السكر Sugar beet yellows، ويمكن تعرف هذا التجمع من النشا بسهولة بواسطة اختبار اليود iodine - potassium iodide بعد إزالة الكلوروفيل من الورقة بواسطة الكحول.

وكان يعتقد ولوقت طويل أن ضعف انتقال النشا يرجع إلى وجود نيكروزيس فى اللحاء، إلا أن تجارب Hanke 1957 على فيروس اصفرار بنجر السكر أوضحت أن انتقال الكربوايدراتات يعطل نتيجة لنشاط غير عادى لإنزيم الفوسفاتير Phosphatase، وأن التغيرات التشريحية تلاحظ فقط بعد أن يقل انتقال الكربوايدرات.

٤ - وتغير كيميائى آخر هو ما اتضح من عمل قطاعات فى أفرع التفاح خاصة صنف

لامبرون Lambourne وصنف لورد Lord المصابة بفيروس الخشب المطاط Rubbery Wood، إذ وجد بعد عمل هذه القطاعات وصبغها بواسطة حمض الهيدروكلوريك hydrochloric acid وصبغة فلوروجلوسينول Phloroglucinol ظهور مناطق كبيرة لونها خفيف، اتضح أن جدر خلاياها سميكة نتيجة لترسب السليلوز Cellulose بدلاً من اللجنين، وأدى هذا إلى مرونة كبيرة للأفرع تجعلها مطاطة. ويوصف هذا التغير غير الطبيعي بأنه الأفرع الخشبية المطاطة Rubbery Wood Symptoms، وتوجد هذه المظاهر على الأشجار المسنة، والتي تسمى Weeping habit، حيث تميل الأفرع الصغيرة تحت ثقلها وثقل المحصول.

ثانيًا : التغيرات السيتولوجية والتشريحية:

Anatomical & Cytological Deviations

وهو تغير في الوحدة الأساسية وهي الخلية. وربما ينظر إلى التغير الذي يحدث في الخلايا على أنه تغير تشريحي، ولكنه أيضاً ذو طبيعة كيميائية Histochemical deviations.

ويجب أن يكون مفهوماً أنه رغم أن هذه التغيرات تكون واضحة في الأنسجة، إلا أن لبعضها أصلاً وراثيًا، ولذلك أطلق على هذه التغيرات مصطلح التغيرات السيتولوجية Cytological deviation.

لا يعرف الكثير عن تأثير الفيروس على شكل Shape الخلايا، ولكن المهم هو تأثير الفيروس على حجم Size وعدد number الخلايا. **وهذا يأخذ أشكالاً عدة يطلق على كل منها اصطلاح خاص به كالآتي:**

١ – اصطلاح Hypertrophy (Cr. hyper = over), trephein - to nourish)

ويستعمل هذا الاصطلاح للزيادة غير الطبيعية في حجم النسيج نتيجة للزيادة غير الطبيعية للخلية، ويمكن استعماله أيضاً للزيادة غير الطبيعية للأعضاء.

٢ – Hyperplasia وهو الزيادة غير الطبيعية في عدد الخلايا (Gr. Plassein to mold)

أما عندما تكون الزيادة في عدد الخلايا غير محدودة تقريباً، كما في حالة النموات

الدرنية Tumors فيستعمل اصطلاح cell proloferation.

٣ – Hypoplasia (Gr. Hypo = under or less than ordinary)

ويشير الاصطلاح إلى تكوين عدد أقل من الخلايا أو الخلايا الأصغر حجماً، ويستعمل أيضاً فى حالة صغر حجم الأعضاء.

٤ – Atrophy يستعمل هذا الاصطلاح فى حالة عدم كبر الخلايا أو الأعضاء؛ نتيجة لعدم تكاثر الخلايا أو عدم زيادة حجمها.

٥ – وقد لوحظ أن التأثير على عدد وحجم الخلايا دائماً ما يؤدى إلى تشوه الأعضاء Malformation

٦ – ومن التغيرات السيتولوجية تغير عادى دائماً ما يوجد فى النباتات المصابة، وهو زيادة تكوين زوائد tyloses كما فى أوعية الخشب الحية فى العنب المصاب بمرض بيرسس Pierce's dis. وهذا يؤدى إلى اختزال النمو وذبول النباتات.

تظهر زوائد من الخلايا الحية البارانشيمية للخشب Wood parenchyma، ومن خلايا الأشعة الوسطى medullary rays وتمر هذه النموات خلال النقر Pits فى جدار الوعاء وتنتفخ إلى بالونات Bladders ذات جدار رقيق فى Lumen الوعاء.

٧ – وهناك تغير آخر تركيبى وهو تكوين الفلين Cork formation.

٨ – وتغير ثامن هو الصلابة turgidity.

٩ – والالتحام الكلى للخلايا collapse ويحدث هذا نتيجة لنقص الرطوبة فى الخلايا.

١٠ – وتغير ينتج عنه موت الخلايا، ويسمى

necrosis (Gr. nekroun - to make dead).

ثالثاً : المظاهر الداخلية للإصابة: Internal Symptoms

التغيرات التى تحدث داخل النباتات المصابة بالفيروسات تكون على نوعين: النوع الأول

هو تغير فى الأنسجة العادية أو كمحتويات الخلية والنوع الثانى هو إنتاج أجسام داخل الخلايا المصابة لا توجد فى الخلايا السليمة.

أ - المحتويات الفيروسية داخل الخلايا : Intracellular inclusions

هذا النوع من التغيير أكثر تمييزاً للأمراض الفيروسية، إذ إن هذه المحتويات لا توجد مصاحبة لأى مرض معدٍ خلاف الأمراض التى تسببها الفيروسات. إنها توجد فى الحيوانات والنباتات المصابة ببعض الفيروسات، ودون شك فإنها نتيجة مباشرة للإصابة الفيروسية، وينظر إليها بعض البحاث كأطوار فى حياة المسبب، والبعض الآخر يعتبرها كتلاً تجمع بروتين النبات.

وكان إيفانوفسكى أول من اكتشف بلورات الفيروس أثناء عمله على مرض موزايك الدخان، وقدم رسومات تمثل المحتويات البلورية فى أوراق الدخان المصاب، هذه المحتويات تسمى حالياً بلورات إيفانوفسكى. كذلك كان إيفانوفسكى أول من كتب عن وجود محتويات أخرى غير بلورية الشكل (أميبية الشكل) والمشهورة فى المراجع تحت اسم أجسام X.

ورغم أن وجود هذه المحتويات يعتبر مميزاً للفيروس، إلا أنها لا توجد مصاحبة لكل الأمراض الفيروسية، فمثلاً لا تلاحظ فى حالات الإصابة بفيروس التفاف أوراق البطاطس وفيروس تجعد أوراق الطماطم واصفرار الاستر، وبعض الفيروسات الأخرى، كما فى الجدول رقم (٦ - ١).

ويعتمد إنتاج المحتويات الداخلية على الفيروس المسبب أكثر من الاعتماد على العائل المصاب، فمثلاً لوحظت بكثرة فى عدد كبير من النباتات المصابة بفيروس موزايك الدخان، وتعذر رؤيتها فى هذه النباتات نفسها عند إصابتها بفيروس موزايك الخيار، رغم أن مظاهر الإصابة الخارجية بالفيروسين تكاد تكون متشابهة.

ويبلغ حجم المحتويات الداخلية من ٥ - ٣٠ ميكرون.

وتختلف الأشكال البلورية المميزة للفيروسات المختلفة، فمثلاً وجود بعض سلالات

فيروس موزايك الدخان يكون بلورات، يمكن تمييزها بسهولة.

وتكون البلورات ذات أشكال منها:

١ – صفائح سداسية Irregular Hexagonal Plates، كما فى فيروس موزايك الدخان.

٢ – بلورات أيزومترية Isometric Crystals مثل فيروس موزايك البسلة.

٣ – بلورات مغزلية Spindle Shaped bodies مثل فيروس الصبار.

٤ – بلورات إبرية Needle Shaped Fibres مثل موزايك الدخان.

ونادراً ما توجد المحتويات البلورية داخل النواة intranuclear inclusions فى النباتات المصابة بالفيرس. وقد وجدها Kassanis 1939 فى نباتات الدخان وبعض النباتات الأخرى المصابة بفيروس etch.

وربما يوجد أكثر من بلورة داخل النواة، كما هو الحال فى البقوليات المصابة بفيروس موزايك البسلة أو الموزايك الأصفر للفاصوليا؛ حيث وجد Mc Whorter عام ١٩٤١ أكثر من خمس بلورات.

تتبع Tcex عام ١٩٥٤ عملية تكوين بلورات إيفانوفسكى فى الخلايا، وكتب عنها الآتى:

يظهر أولاً فى بروتوبلازم الخلايا المصابة فقاعات متلاصقة كثيفة، يصل قطرها إلى بضع ميكرونات. ترتبط هذه الفقاعات وتلتصق ببعضها وتصبح ذات سيمترية وكالمرآة، ثم تنمو مكونة بلورات مستديرة مبتدئة من الخارج إلى الداخل، متحولة تدريجيًّا إلى صفائح سداسية. هذه الصفائح تكون فى بادىء الأمر رقيقة، وتتكون من عدد غير كبير من الطبقات ثم يزداد عدد طبقاتها باطراد النمو.

وذكر أيضاً أنه فى أثناء حياة الخلايا فإن البلورات أحياناً ما تتعرض إلى أن تسيل (تذوب) وتتحول إلى تركيب خيطى.

المحتويات الأمورفية أو أجسام X توجد فى كثير من الأمراض الفيروسية. وقد ثبتت

علاقتها بالإصابة الفيروسية، كما هو الحال فى الإصابة بفيروس موزايك الدخان وفيروس النقط الحلقية الدخان.

وتتركز الأهمية فى التشخيص على هذه المحتويات الأمورفية؛ حيث إنها تختلف بوضوح عن باقى محتويات الخلية.

يتضح من دراسة مورفولوجى أن أجسام X التى تكونها فيروسات مختلفة تكون غير متشابهة، فبعض السلالات لفيروس موزايك الدخان وفيروس برونز الطماطم وفيروس تقزم الأرز، وفيروس موزايك التيوليب، وفيروسات أخرى تكون فيها أجسام X ذات بناء هش، يحتوى على فراغ أو أكثر. وفيروس تجعد قمة بنجر السكر وفيروس موزايك البصل تكون أجسام X فيها متلاصقة دون فقاقيع أو فراغات.

للوسط الموجود به الفيروس تأثير على شكل المحتويات الداخلية؛ فمثلاً يكون فيروس موزايك الدخان داخل الخلايا النباتية بلورات سداسية الشكل، ولكنه فى حالة إضافة كبريتات أمونيوم إلى عصير النبات المصاب.. فإنه يترسب على هيئة باراكريستال، ويكون فيروس X البطاطس داخل الخلايا أجساماً أميبية الشكل، أو فى حالة صبه فى أنابيب فإنه يعطى راسبًا أمورفيًا وفى بعض الحالات فإنه يكون سائلاً بلوريًا.

ويمكن أن تتغير الأشكال المختلفة للمحتويات الفيروسية طبقاً لخواص بروتوبلازم الخلايا. فمثلاً نجد أن فيروس Striate Mosaic يكون فى خلايا نباتات الشوفان المصابة محتويات على هيئة بلورات إبرية طويلة متراصة، ويكون فى خلايا نبات Couch Grass quak grass *(Agropyrum tenerum)* الزاحف بلورات مغزلية الشكل Spindle Like، ويكون فى النسيج الداخلى للحشرة الناقلة ***Liburoia striatella*** محتويات أمورفية مفرغة.

وتكون سلالة فيروس الدخان المسماة Aucuba Mosaic V. فى خلايا كثير من أصناف النباتات التابعة لعائلات مختلفة، فى ثلاث أشكال مختلفة من المحتويات الفيروسية، وهى أجسام X الأمورفية، باراكريستال إبرية وصفائح بلورية سداسية. وفى خلايا نبات *Dallinsia bicolor* المصاب بهذا الفيروس تتكون أجسام X الأمورفية فقط.

قد يكون للعمليات التحضيرية التى تجرى عند تحضير العينات النباتية المصابة لفحصها

تأثير فى تكوين محتويات داخلية، كما هو الحال فى حالة تأثير محاليل الأملاح الحمضية المستعملة فى تثبيت Fixation أنسجة نباتات القمح المصابة بفيروس موزايك القمح الشتوى المعروف بأنه لا يكون محتويات داخلية، إذ يظهر فيها أجسام باراكريستال كبيرة.

ويلخص عمل جولدن Golden 1954 عن موضوع المحتويات الفيروسية داخل خلايا النبات المصاب فى الآتى:

١ – مجموعة الأجسام الأميبية أو أجسام X ليست من أصل واحد، وكل ما هو معروف للآن أنها تكوين بروتينى ولكن طبقاً لخواصها الكيماوية والطبيعية فإنها مختلفة كلية. وفى حالة الإصابة بفيروس موزايك الدخان، فإن تكوين هذه المحتويات فى الخلايا الحية لا يتبع الطريق نفسه الذى تتبعه تكوين أجسام X الخاصة بالموزايك الأصفر، من حيث الذوبان، الشكل، المحتويات، تطورها ونموها، وخلايا النبات حيث يختلف كل عن الآخر اختلافاً كلياً.

٢ – حيث إن ظهور المحتويات الفيروسية فى خلايا النبات يأخذ طرقاً مختلفة: فعند تكون محتويات أحد الفيروسات يمكن أن يلعب أحد العوامل دوراً لا يلعبه عند تكوين محتويات الفيروس الآخر، مثل: عمر النبات عند المرض، عوامل خارجية، ولذلك فإنه يسلك طريقاً آخر عند تكوينه.

٣ – المحتويات الفيروسية توجد حيث توجد الجزيئات الفيروسية.

٤ – يدل مورفولوجى المحتويات الفيروسية فى خلايا النباتات المختلفة على أن لكل فيروس علامات مميزة (محتويات)، ولا تتوقف فى كل الحالات على الخواص الفردية للعائل.

٥ – المحتويات الفيروسية ذات مناعة عالية للظروف الخارجية، ولهذا فيمكن الاعتماد عليها فى حالة دراسة فيروسات الأمراض النباتية المختلفة.

٦ – المحتويات البلّورية قادرة على التغير فى الخلايا الحية، ولكن لكى يحصل هذا فلابد من توفر ظروف خاصة.

٧ – المحتويات المختلفة ذات مقاومة عالية من حيث الشكل والتركيب، وفى حالات نادرة يحصل لها تغيير.

٨ – تمثل بلورات إيفانوفسكى جزيئات فيروسية بروتينية.

٩ – تمثل المحتويات البلورية داخل الخلايا تركيزاً للفيروس، فهناك علاقة متينة بين وجود هذه المحتويات وتركيز فيروس موزايك الدخان فى خلايا النبات.

١٠ – تنتشر المحتويات البلّورية الناشئة نتيجة للإصابة بموزايك الدخان داخل الخلايا بكميات مختلفة حتى أنه فى خلايا النسيج الواحد تكون كميتها مختلفة.

١١ – يؤكد العلماء الروس باستمرار أهمية المحتويات الفيروسية لتقسيم وتمييز الفيروسات النباتية، فيذكر Golden باستمرار أن المحتويات الفيروسية يمكن أن تعتبر اختباراً مؤكداً. وحسب تجاربه أمكنه القول أنه يمكن اعتبار تحليل المحتويات الفيروسية وسيلة واسعة الانتشار لملاحظة وتقدير وتقسيم الفيروسات المختلفة ودراسة خواصها الأساسية، كما أنه يمكن استعمالها كطريقة للكشف عن الفيروسات المتخفية Masked V.

تعتبر شيفيلد Sheffield ١٩٤٨ أن المحتويات تتكون من بروتين الفيروس. وأوضح Steere & Williams عام ١٩٥٣ بواسطة عزل المحتويات والفحص والميكروسكوب الإلكترونى أن البلورات ما هى إلا جزيئات فيروسية ومذيب طيار.

وتمكن براندز Brandes عام ١٩٥٦ بواسطة القطاعات الرفيعة/ Ultrathin Sections من أن يجد أجسام X فيروس موزايك الدخان تتكون من جزيئات فيروسية فى ترتيب غير عادى Irregular Arrangement، ومحاطة تقريباً بغشاء Membrane، وعلى عكس هذا فى المحتويات البلورية حيث تظهر ترتيباً منتظماً Regular بلورياً للجزيئات الفيروسية. ووجد أن الأشكال المغزلية Spindles التى عثر عليها فى نباتات الصبار تحتوى على جزيئات فيروسية معدية فى ترتيب مميز.

أما كيف تجمعت جزيئات الفيروس فى هذه التركيبات فهو أمر غير معروف.

وأطلق Mc Whorter عام ١٩٤١ اسم Viroplasts على المحتويات الداخلية، ووجد Kassanis & Sheffield عام ١٩٤١ أن المحتويات الداخلية ممكن أن توجد مستقلة، كما يمكن أن تتحول المحتويات الأمورفية إلى محتويات بلورية.

فحص الأجسام الأميبية والبلّورية لفيروس موزايك الدخان :

يمكن رؤية الأجسام البلّورية لفيروس موزايك الدخان بوضوح فى شعيرات أوراق نبات الدخان المصاب باتباع الآتى :

١ – يعمل بواسطة حافة موسى حاد سلخ بسيط فى عرق على السطح السفلى للورقة المصابة .

٢ – يوضع السلخ بسرعة وباحتراس – حتى لا تتكسر شعيراته – فى نقطة ماء على شريحة زجاجية، ويغطى بغطاء زجاجى .

٣ – يفحص التحضير أولاً فى تكبير ٢٥٠ – ٣٠٠ مرة والشعيرات، التى يلاحظ بها محتويات زجاجية المظهر تفحص بتكبير أكبر .

فى حالة الإصابة بفيروس موزايك الدخان العادى، يمكن أن تلاحظ صفيحة أو أكثر رقيقة ذات منظر زجاجى وشكل سداسى فى جميع خلايا الشعيرات، ورؤية مثل هذه المحتويات تؤكد وجود الفيروس فى حالة الإصابة بسلالات مختلفة من فيروسات هذه المجموعة . ويلاحظ فى أول خلايا من قاعدة الشعيرة أجسام زجاجية، وفى آخر الخلايا صفائح سداسية .

زيادة فى تأكيد التشخيص يظهر أيضاً فى هذه الخلايا بلورات إبرية أو خيطية وأجسام أميبية X ويلاحظ أن جميع أجسام X ذات شكل خارجى واحد مع النواة، وتتميز عنها بغياب النوية .

ومن المهم أن نتذكر الآتى :

١ – ليس من الضرورى وجود الصفائح الزجاجية الشكل فى جميع شعيرات السلخ الذى يفحص، ولكن إن وجدت فى إحدى خلايا الشعيرة فلابد من وجودها فى جميع خلايا هذه الشعيرة، ونادراً جداً ما يرى (فى بعض خلايا الشعيرة) بلورات أو جزيئات متكافئة، والتى تظهر على أنها ليست محتويات فيروسية .

٢ – لملاحظة المحتويات الفيروسية يفحص عادة سلخ واحد بكل دقة . وفى حالة النتيجة السلبية يؤخذ سلخ آخر، ومن نبات واحد تؤخذ تسعة سلوخ من ثلاث ورقات علوية

وثلاث وسطية وثلاث فى قاعدة الساق، وينصح باستعمال أوراق، تكون مظاهر الإصابة عليها واضحة.

٣ – فى حالة تهتك خلايا الشعيرة فإن المحتويات الفيروسية البلورية سرعان ما تذوب وتختفى.

٤ – عند معاملة السلخ بحامض هيدروكلوريك واحد على مائة عيارى، فإن المحتويات البلّورية ترسب على هيئة بلورات إبرية.

٥ – المحتويات الفيروسية تثبت جيداً بواسطة حمض بكريك، وفى هذه الحالة تأخذ اللون الأصفر الفاتح.

أما الأجسام الأميبية فيجب صبغها حتى يمكن رؤيتها بوضوح، وتستخدم لذلك طرق عدة، منها الطريقة الآتية:

أ – عمل سلخ من بشرة ورقة مصابة.

ب – يثبت السلخ فى محلول مكون من ٠,٢٥٪ ثيوسلفات الصوديوم فى ٥٠٪ كحول لمدة ١٠ دقائق.

جـ – ينقل السلخ إلى كحول ٥٠٪ لمدة ١٠ دقائق ثم كحول ٧٠٪ لمدة ٥ دقائق، ثم كحول ٩٥٪ لمدة خمس دقائق.

د – يوضع السلخ فى طبق بترى به ماء لمدة ٣٥ دقيقة، ثم ينقل على شريحة زجاجية ويجفف من الماء.

هـ – يغمر السلخ بصبغة الجيمسا لمدة ٧ دقائق، ثم يغسل عدة مرات بالماء لمدة ٣٠ دقيقة.

و – يوضع السلخ على شريحة ويجفف، ثم تضاف إليه عدة نقط من كحول إيثايل نقى لعدة ثوان، حيث سيتغير اللون من البنفسجى إلى اللون الأزرق، وعندها يجب إضافة بعض نقط من زيت القرنفل على السلخ بعد التخلص من الكحول.

ز – يجدد زيت القرنفل عدة مرات إلى أن يقف تلونه باللون الأزرق، ثم يجفف السلخ من زيت القرنفل ويغمر بالزيلول لمدة ١٠ دقائق، يجفف بعدها الزيلول ويضاف كندا بلسم ويغطى بغطاء شريحة.

جدول (٦-١) : الفيروسات المنتجة للمحتويات الداخلية، وأنواعها، وأشكالها، وأماكن تواجدها فى خلايا العائل.

اسم الفيروس	نوع الأجسام الداخلية	مكان تواجدها	شكلها
١ - السلالة العادية من فيروس موزايك الدخان (Common - TMV Strain)	- بلورات - أجسام امورفية (x-bodies)	السيتوبلازم	- سداسية - غير منتظمة الشكل ومحببة وبها فراغات
٢ - سلالة الاكيوبا لفيروس موزايك الدخان (Aucuba - TMV Strain) ملاحظة: تكون أمورفية فقط فى نبات *Sallinsia bicolar*	- بلورات - باراكريستال. - أجسام امورفية (x-bodies)	السيتوبلازم	- سداسية - غير منتظمة الشكل ومحببة
٣ - فيروس إتش الدخان (TEV)	- بلورات - أجسام بريمية (Pinewheel) أو أسطوانية (Cylindrical)	النواة السيتوبلازم	

يتبـــع :

اسم الفيروس	نوع الأجسام الداخلية	مكان تواجدها	شكلها
٤ – فيروس موزايك البطيخ (WMV)	– أجسام بريمية أو اسطوانية – أجسام مساعدة (Sallinsia bodies)	السيتوبلازم فى النواة	
٥ – فيروس التبقع الحلقى فى الدخان (TRSV)	– بلورات	السيتوبلازم	– الياف
٦ – فيروس الموزايك الأصفر فى البسلة (PYMV)	– بلورات	النواة	
٧ – فيروس تقزم الأرز (RDV)	– أجسام X – (x- bodies) – بلورات	السيتوبلازم فى أنسجة الحشرات	– ذات بناء هش به فـــراغ أو أكثر *Nephotetix cinetepes*
٨ – فيروس موزايك التيوليب (TuMV)	– أجسام X – (x- bodies)	السيتوبلازم	– ذات بناء هش به فـــراغ أو أكثر

يتبـــع :

اسم الفيروس	نوع الأجسام الداخلية	مكان تواجدها	شكلها
٩ – فيروس اللون البرونزى فى الطماطم (TBV)	– أجسام X – (x- bodies)	السيتوبلازم	– ذات بناء هش به فراغ أو أكثر
١٠ – فيروس تجعد البنجر السكر (SBCTV) ١١ – فيروس موزايك البصل (OMV)	– أجسام X – (x- bodies)	السيتوبلازم	– متلاصقة دون فقاقيع أو فراغات
١٢ – فيروس التخطيط الموزايكى فى القمح (WSMV)	بلورات	السيتوبلازم	– إبرية طويلة متراصة فى الشوفان – القمح – الذرة – الشعير.
	بلورات	السيتوبلازم	– مغزلية فى نبات *Agropyrum tenerum*
	أمورفية	فى أنسجة الحشرات	– مفرغة فى حشرة *Striatella Liburnia*

اسم الفيروس	نوع الأجسام الداخلية	مكان تواجدها	شكلها
١٣ – فيروس X البطاطس (PVX)	أمورفية	السيتوبلازم	– أميبية الشكل
	بلورات أو شبه بلورى	السيتوبلازم	
١٤ – فيروس الموزايك الأصفر فى الفاصوليا (BYMV)	بلورات	النواة	
١٥ – فيروس Y البطاطس (PVY)	Laminated bodies	السيتوبلازم	– أجسام مسطحة شبه العجلة
	– أجسام بريمية (PW) أو اسطوانية	السيتوبلازم	
١٦ – فيروس الراى جراس موزايك (RyMV)			
١٧ – فيروس موزايك الأجروبيرون (AgMV)	– أجسام بريمية	السيتوبلازم	
	– أجسام بريمية	السيتوبلازم	
١٨ – فيروس موزايك البروم (BoMV)			
١٩ – فيروس تبقع الفول (BBMV)	– أمورفية	السيتوبلازم	– قد تفوق حجم النواة
٢٠– فيروس الموزايك الملون فى اللوبية (CoCMV)			
٢١ – فيروس تبقع الفاصوليا (BsMV)			

يتبـــع :

اسم الفيروس	نوع الأجسام الداخلية	مكان تواجدها	شكلها
٢٢ – فيروس اصفرار البنجر (BYV) ٢٣ – فيروس تبقع قرون الفاصوليا (BPMV) ٢٤ – فيروس النيكروزسيس المنقط فى القرنفل (CaNV)	– امورفية	السيتوبلازم	– قد تفوق حجم النواة
٢٥ – فيروس موزايك الرايجراس (RyMV) ٢٦ – فيروس Sun hep (ShMV)	– بلورية	السيتوبلازم	– دائرية الحواف
٢٧ – فيروس التبقع الأخضر فى الخيار (CGMV)	– بلورية	السيتوبلازم	– شبه سداسية (صفائح رقيقة).
٢٨ – فيروس التفاف قمة البنجر (بنجر السكر) (SBCTV)	– امورفية	السيتوبلازم	– بجوار النواة.
٢٩ – فيروس الذبول فى الفول (BBWV) ٣٠ – فيروس موزايك الباذنجان البرازيلى (BEMV)	– امورفية – وبلورات	السيتوبلازم	– عديدة الأوجه.

يتبع :

اسم الفيروس	نوع الأجسام الداخلية	مكان تواجدها	شكلها
٣١ – فيروس موزايك القمح المنقول بالتربة (SBWMV)	– بلورية .	السيتوبلازم	– إبرية داخل أغشية متراكمة من الشبكة الإندوبلازمية .
٣٢ – فيروس موزايك البسلة (PeMV) ٣٣ – فيروس الورقة المروحية في الرسيرى (RGFV) ٣٤ – فيروس التفاف الأوراق فى الكريز (CLRV) ٣٥ – فيروس موزايك الأرابس (AMV) ٣٦ – فيروس النقط الحلقية فى الراسيرى (RRSV)	– أجسام أنبوبية	السيتوبلازم	
٣٧ – فيروس التبقع فى الدخان (TMV)	– أجسام داخلية (مكونات نباتية متحورة)	السيتوبلازم	– ميتاكوندريا متحورة متجمعة .
٣٨ – فيروس موزايك اللفت الأصفر (TuYMV)			– كلورو بلاستيدات متحورة متجمعة .

يتبـــع :

اسم الفيروس	نوع الأجسام الداخلية	مكان تواجدها	شكلها
٣٩ – فيروس شفافية العروق فى البيتونيا (PeVCV)	– مناطق نووية كاذبة Pesudonucleolar regions	السيتوبلازم	
٤٠ – فيروس (TRV) ٤١ – فيروس الذبول المنقط فى الطماطم (TSWV)	– أجسام داخلية مكونة من جزيئات فيروسية	السيتوبلازم	
٤٢ – فيروس موازيك القرنبيط (CaMV) ٤٣ – فيروس موزايك الداليا (DMV) ٤٤ – فيروس إتش الحلقى فى القرنفل (CaRV) ٤٥ – فيروس التقزم الأصفر فى اللفت (TuYSV) ٤٦ – فيروس تقزم الورق فى الشليك (StSV) ٤٧ – فيروس موزايك المارابيلس (MaMV)	– أجسام داخلية بها أجسام جولجى	السيتوبلازم	– مستديرة أو مستطيلة بها جزيئات فيروسية
٤٨ – فيروس النيكروزسيس الأصفر فى الخس (LYNV)	– تضخم النواة	النواة	– وبها فجوات .

يتبـــع :

اسم الفيروس	نوع الأجسام الداخلية	مكان تواجدها	شكلها
٤٩ – فيروس التقزم الاصفر فى البطاطس (PYDV) ٥٠ – فيروس التخطيط الموزايكى الأصفر فى الشعير (BYSMV) ٥١ – فيروس التقزم الأصفر فى البنجر (SBYSV)	– أجسام أمورفية	السيتوبلازم	
٥٢ – فيروس التدرن الجرحى (WTV) ٥٣ – فيروس تقزم الأرز (RDV) ٥٤ – فيروس تقزم الذرة (MDV)	– أجسام داخلية مشابهة لمرض فيجى فى قصب السكر	السيتوبلازم	– أجسام بروتينية فيروسية .
٥٥ – فيروس التقزم والتخطيط الأسود فى الأرز (RDSBV) ٥٦ – فيروس العقم فى الشوفان (OSV) ٥٧ – فيروس التقزم الخشن فى الذرة (MRDV) ٥٨ – فيروس الزائد فى اللوبيا (CoEV) ٥٩ – فيروس تقزم البلانجو (PaSV)	– أجسام دقيقة حبيبية	السيتوبلازم	– قد تكون إبرية .
٦٠ – فيروس التخطيط فى الذرة (MSV)	Bundles	السيتوبلازم	– حزم من (FEO) وحزم من الأغشية فى اللحاء .

عند فحص السلخ سنجد أن الأجسام الأميبية وتأخذ لونًا بنفسجيًا أما باقى أجزاء الخلية فتأخذ اللون الأزرق أو اللون الأزرق المخضر.

ب - التغيرات السيتولوجية والتشريحية الداخلية:

Cytological & Anatomical changes

كما يحدث فى النباتات المصابة بالفيروسات نوع آخر من التغيرات الداخلية أكثر توافقًا مع المظاهر الخارجية. وعمومًا فإن الفيروسات التى تسبب، مظاهر إصابة خارجية متشابهة تسبب أيضًا تغيرات داخلية متشابهة فى الخلايا.

وأوضح تغير يكون فى جهاز البلاستيدات؛ فمثلاً فى حالة أمراض الموزايك كما فى حالة أمراض الاصفرار تقل كمية الكلوروفيل فى البلاستيدات، ويختزل حجم البلاستيدات فى الخلايا المصابة علاوة على أن أجزاء منها تتكسر، وتكون البلاستيدات الخضراء أكثر حبيبية وأقل فى لونها، وعادة ما يكون شكلها غيرمنتظم.

وفى نواة الخلايا المصابة يحدث تغير، ففى خلايا النباتات المصابة بالموزايك، وفى بداية الإصابة يقل حجم النواة بوضوح، وفى الوقت نفسه يقل امتصاص النواة للأشعة فوق البنفسجية، وهذا يدل على نقص كمية أحماض النواة فيها. وفى حالة إصابة بنجر السكر بفيروس تجعد القمة وجد أنه فى بداية الإصابة تتأثر النواة فى نسيج الكمبيوم فيزداد حجمها ويصبح شكلها غيرمنتظم، وأخيراً تتكسر إلى عدد ٥ - ٧ نويات فى الخلايا البرانشيمية، بينما هى فى العادة ١-٢ نواة.

ويحصل خلل فى التبادل الغذائى داخل النباتات المصابة ببعض الفيروسات، يكون من نتيجته تجمع غير عادى لبعض مواد التمثيل فى الخلايا، فمثلاً يلاحظ فى حالة الإصابة بفيروسات الاصفرار تجمع ملحوظ للنشا فى خلايا المناطق الصفراء.

كذلك فى حالة مرض التفاف أوراق البطاطس حيث البلاستيدات الخضراء تمتلئ بالنشا وربما تنفجر.

ويحدث فى حالة كثير من الأمراض الفيروسية تجمع لصبغة الأنثوسيانين فى فراغات

الخلايا؛ مما يؤدى إلى تغير فى لون السوق والأوراق.

وتسبب بعض الفيروسات تغيراً فى التركيب التشريحى لأجزاء مختلفة من النبات المصاب، ففى مرض التفاف أوراق البطاطس ومرض Sereh لقصب السكر و مرض تجعد قمة بنجر السكر وتجعد الشليك وإصفرار الأستر يصحب التجميع الزائد للكربوايدرات شذوذ فى أنسجة اللحاء، ففى البطاطس يظهر بالأنابيب الغربالية والخلايا المرافقة أجزاء ميتة (نيكروزيس). كما تسبب فيروسات التفاف الأوراق نيكروزيس فى درنات بعض أصناف البطاطس، وكذلك يوجد نيكروزيس فى اللحاء، ويمتد إلى البريسيكل فى نباتات بنجر السكر المصابة بتجعد القمة. ويظهر على البطاطس المصاب بنيكروزيس القمة موت لأجزاء من اللحاء فى السوق والأوراق والدرنات، فيبدأ النيكروزيس فى اللحاء، وبعد أن يعم اللحاء ينتشر منه إلى الأنسجة الأخرى. يبدأ النيكروزيس بظهور فراغات فى الخلايا، تمتلئ بمواد صمغية ثم تتغلظ جدر الخلايا لترسيب اللجنين أو السوبرين بينما تختفى محتويات الخلية أو تتحول إلى مواد قاتمة غنية فى البكتين، ودائماً ما يتكون نسيج فلينى حول المناطق النيكروزيسية خاصة فى الدرنات، وهو طبقات من الخلايا الفلينية التى أحياناً ماتتصل ببعضها مكونة حلقة حول الجزء الميت.

ويصحب الإصابة بالفيروسات تغير فى حجم وشكل ونمو الخلايا، ففى حالة الإصابة بالموزايك يتغير شكل خلايا الورقة فى المنطقة الصفراء، وتكون هذه المناطق أقل سمكاً من مناطق الورقة الأخرى نتيجة لاختزال فى أطوال خلايا النسيج العمادى **Palisade cells** وصغر المسافات البينية. كما لوحظ اختزال شديد فى حجم الخلية فى أنسجة نباتات الشعير المصابة بفيروس **Striate mosaic**، وفى النموات الخيطية لدرنات البطاطس المصابة بمرض ستلبور.

تأخذ بعض التغيرات شكل تكوين نموات داخلية جديدة، فمثلاً مرض فيجى قصب السكر تظهر فى اللحاء نموات كروية **galls** نتيجة لنمو شاذ فى خلايا اللحاء وبارنشيمية اللحاء.

أولاً : المظاهر الخارجية للإصابة بالفيروس : External symptoms

تعنى كلمة مظاهر الإصابة Symptoms توضيح التغيرات المرئية الموجودة على النبات نتيجة الإصابة بسبب المرض، ويعبر عنها باصطلاحات قد تبين النتيجة النهائية، مثل : الحافة الصفراء والتبقع فى الورقة، أو تبين العمليات التى تغير من مظهر النبات المصاب مثل عملية الاصفرار والتبقع (Yellowing or edge yellowing), (mottle or mottling) .

ويفضل استعمال الاصطلاح الأول؛ حيث إن الاصطلاح الثانى يستعمل غالبًا للدلالة على المرض وليس على مظهر الإصابة، وحيث إنه لا توجد اصطلاحات تعبر عن العمليات التى تسبب المظاهرغير العادية مثل الموزايك لذلك فإن كلا الاتجاهين قد يستعمل فى التسمية، وقد تكون هناك بعض الاصطلاحات، التى تبين العملية والنتيجة معًا مثل التشوهات malformation **ومن أهم هذه المظاهر ما يلى:**

١ - صغر الحجم: Dwarfing

تؤدى الإصابة بمعظم الفيروسات إلى نقص فى حجم النبات المصاب عن النبات السليم، وعندما يكون هذا النقص واضحًا يطلق عليه اسم التقزم Dwarfing or stunting ويكون التأثير واضحًا إذا ما أصيب النبات فى سن مبكر؛ إذ يكون ظاهرًا على أطراف الأفرع أو فى قمة النبات، كما هو الحال فى مرض تقزم البسلة. pea stunt dis .

ودائمًا ما يؤدى النقص فى حجم النبات إلى انتاج ثمار صغيرة الحجم، وقد يصل حجم الثمار فى بعض الحالات نصف الحجم الطبيعى.

وفى بعض الأحوال يحدث صغر فى حجم النبات دون ظهور مظاهر أخرى، غير أن هذا ينعكس على حجم الثمار أو قلة فى المحصول. وحيث إن هناك عوامل أخرى تتدخل فى المحصول كالتغذية.. لذلك فمن الصعب القول بأنها ناتجة عن إصابة فيروسية.

٢ - التغيرات فى اللون: Colour deviations

يعتبر التغير فى اللون مظهرًا شائعًا فى النباتات المصابة بالفيروس، ويحدث مثل هذا التغير فى الأوراق والسيقان والأزهار والثمار، وحيث إن الأوراق تشغل الجزء الأكبر من سطح

النبات فإن التغير فى لونها يجذب الانتباه ولذلك درس أكثر تفصيلاً.

ويرجع التغير فى اللون فى الأوراق، وفى أغلب الأحوال إلى عدم الانتظام فى إنتاج الكلوروفيل مثل التأخر أو النقص فى انتاجه، وهذا قد يفسر لماذا تختفى مظاهر الموزايك بعد مرور قليل من الوقت. وقد يحدث تحطيم للكلوروبلاستيدات ينتج عنه انخفاض محتوى الكلوروفيل، ويسبب هذا لونًا اخضر أو أصفر، وتسمى هذه الظاهرة كلوروسيس (Cr. chloros light green)، وقد تغيب كل الصبغات، وهذا فى أشد حالات الكلوروسيس، وتسمى هذه الظاهرة الإبياض Blanching or Bleaching، وعادة ما تؤدى بعض التغيرات التشريحية مثل الشكل الكروى لخلايا البلاستيدات وكذلك تأخر تكوين المسافات بين الخلايا فى الميزوفيل إلى التأثير على اللون الأخضر فى الورقة.

وعند غياب الكلوروفيل، يظهر تأثير الكاروتين والاكزانثوفيل فى النسيج الملون مسببًا اصفرار هذا النسيج، ويسمى هذا المظهر بالاصفرار yellowing، ويكون هذا واضحًا فى النباتات التى تحتوى طبيعيًا على نسبة عالية من هذه الصبغات.

ويسبب التغير بالزيادة فى صبغة الانثوسيانين اللون الأحمر redding أو اللون القرمزى Purpling لأجزاء النبات المصاب كالأوراق والأزهار وحيث إن لصبغة الانثوسيانين علاقة بالسكريات فإن الاضطراب فى ميثابوليزم السكريات قد يكون السبب، وهذا الاقتراح لأن التلون الاحمر أو القرمزى دائمًا ما يصبحا أمراضًا مثل فيروس التفاف أوراق البطاطس وفيروس اصفرار وتقزم الشعير فى الشوفان، كما أن هذه الأمراض تسببها فيروسات غالبًا ما توجد فى اللحاء ويميزها، أو يصحبها اضطرابات فى تمثيل الكربوهيدرات.

ولوحظ أيضًا إنتاج مواد قاتمة اللون، مواد شبيهة بالميلانينات melaning مسببة اللون البنى Browning فى الأنسجة الميتة (نيكروسيس) أو لون أسود Blacking أما إذا كان النيكروزيس سطحيًا مثل وجوده فى الابيدرمس.. فإن اللون ربما يكون برونزيًا Bronzing. ولا يلاحظ إفراز الميلانينات إذا ما تسبب موت النسيج عن الجفاف السريع، وفى هذه الحالة ربما يأخذ النسيج الميت الجاف لونًا رماديًا فضيًا silvery gray أو مبيضًا. وسنتناول **مظاهر تغير اللون فى الأجزاء المختلفة من النبات المصاب كالآتى:**

أ - تغير اللون في الأوراق : Colour deviations

يعطى اصطلاح موزايك Mosaic لكثير من مظاهر إصابة الورقة، ويعنى هذا الاصطلاح وجود مناطق خضراء أو صفراء قاتمة أو فاتحة ذات شكل غيرمنتظم، ولها حدود منتظمة واضحة Sharply، كما هو الحال فى البلاط الموزايكى، والتى منها اشتق الاسم.

وأول من اطلق هذا الاصطلاح هو ماير Mayer عام ١٨٨٦، أطلقه على عَرَض مرض الدخان، ومن هذا التاريخ عرفت مظاهر الموزايك، واستعمل هذا الاصطلاح ولمدة طويلة مرادفًا للأمراض الفيروسية، كما استعمل أيضًا فى ذلك الوقت بدلاً من اصطلاح variega-tion والمثل الواضح لهذا هو موزايك أبو خنجر، والذى يسمى حاليًا Abutilion infectious variegation، **وتطلق تسميات عديدة على أشكال مختلفة من الموزايك مثل :**

اكيوباموزايك Aucuba mosaic نسبة إلى تلون أوراق النباتات *Aucuba bapwis var. variegatum*، وكذلك اسم Calico m. نسبة إلى التلون على أوراق نبات Calico أى لون أصفر زاهٍ Brilliant yellow، أو أحيانًا كثيرة ما يكون اللون مبيضًا فى بعض أجزاء الورقة، كماهو الحال فى فيروس كاليكو البطاطس Potato calico وفيروس كاليكو الخوخ Peach calico v.، وربما يوصف الموزايك على أنه شديد أو خفيف (معتدل) Severe or mild أو موزايك مخضر أو مصفر yellow or green mosaic، وقد تأخذ ظاهرة الموزايك شكلاً خاصًا كما هو الحال فى نباتات الفلقة الواحدة ذات العروق المتوازية، وتكون فيها المناطق الملونة طولية، ويسمى فى هذه الحالة التخطيط Streaking or stripping، وقد يكون الموزايك منحصرًا فى مناطق محدودة مثل موزايك العروق ويسمى Vein mosaic؛ حيث تظهر الأجزاء خفيفة اللون متجمعة بطول العروق الرئيسية، كما هو الحال فى فيروس موزايك العروق فى البرسيم الأحمر red clover vein mosaic، وفى فيروس موزايك التفاح apple mosaic. وربما يطلق على هذه الظاهرة كلوروسيس العروق V. chlorosis أو اصفرار العروق Vein yellowing، ولكن اصطلاح الموزايك يوضح أن المناطق الباهتة غيرمنتظمة وأن التلوين غير الطبيعى موزع بغير نظام حول عروق الورقة، ويستعمل اصطلاح تحزم العروق vein banding فى حالة وجود مناطق قاتمة حول العروق، كما هو فى حالة فيروس تحزم

العروق الراسبرى rasberry vein banding وفيروس موزايك الورد .rose mosaic v.

وإذ وجد الموزايك بين العروق الكبيرة يستعمل اصطلاح موزايك بين العروق Intervei-nal mosaic مثل مظاهر الإصابة ببعض سلالات فيروس X البطاطس PVX، **وقد يعطى الموزايك أسماء مختلفة طبقًا لحجمه وشكله مثل:** Speckling , Dotting , Flecking , Spotting.

ويطلق اسم التبقع الحلقى Ring spot، عندما يأخذ التلون شكلاً حلقيًا، ويميز هذا المظهر مجموعة مهمة من الفيروسات، تظهره على عوائل خاصة، ولهذا تسمى مجموعة فيروسات البقع الحلقية Ring spot viruses وأحيانًا تأخذ المناطق الملونة شكل النجوم فتسمى التبقع النجمى Asteroid spotting. وإذا كانت المناطق الملونة ذات حواف باهتة غير محدودة فتسمى هذه الظاهرة بالتبقع mottling، وهناك خلاف فى المراجع بين استعمال كلمة الموزايك وكلمة التبقع، ولو أنهما يستعملان كمترادفين، فإنه وفى بعض الأحوال يكون تغير اللون الذى يطلق عليه variegation نتيجة لتواجد نظام من اللون الأخضر المصفر الواضح، فيكون إما من خط أو خطوط متجمعة فى حزم، ويسمى هذا Line pattern أو ربما يأخذ شكل ورقة البلوط فيطلق عليه Oak Leaf pattern، وقد يأخذ شكل حلقات rings، ومن أمثلة النظام المخطط إصابة الخوخ والكريز بفيروسات النظام المخطط Line pattern viruses، وقد يظهر أحيانًا لون رصاصى مفضض Silver gray، كما هو الحال فى مرض التخطيط فى النرجس Stripe disease of narcissus، وقد يتغير لون الورقة من لونها الطبيعى إلى اللون الأخضر القاتم كما فى مرض الخوخ المزيف Phony Dis، وقد توجد صفة الاحمرار redding أو اللون القرمزى Purpling، وتتشابه هذه المظاهر إلى حد كبير مع المظاهر التى ترى نتيجة لنقص المعادن mineral defecincies. يمثل اللون البنفسجى مرض ذبول قمة البطاطس Potato purple top wilt Dis، وكذلك يسبب فيروس التقزم الأصفر للشعير Barley yellow dwarf تلونًا أحمر برتقاليًا واضحًا على الشوفان، ويسمى Oat red leaf.

إن إنتاج مواد غامقة سوداء تشبه الميلانين melanins فى الأنسجة الميتة مؤدية إلى اللون

البنى Browning أو الأســـود Blacking يعتبر أمرًا طبيعيًا فى أمراض الفيروس خاصة النيكروزيس. أما اللون البرونزى Bronzing فنادر الوجود، ويتسبب عن النيكروزيس وتزاحم فى خلايا البشرة فوق الميزوفيل الأخضر مع الصلابة turgid، وهذا يوجد فى حالة الإصابة بفيروس الذبول المنقط فى الطماطم .tomato spotted wilt V، ويظهر على هيئة حلقات كنسيج شبكى حول العروق الصغيرة، وقد يغطى مساحة كبيرة من سطح الورقة، وقد يؤدى اللون القرمزى إلى نيكروزيس سطحى etching غير عميق.

ب - تغير اللون فى السيقان : Colour deviation in stems

تعكس السيقان تغيرات غير طبيعية فى المستوى الكلوروفيلى كالتى تحدث فى الأوراق؛ حيث إن السيقان الغضة herbaceous بها محتويات كلوروفيل كالتى بالأوراق. ويرجع معظم التغير فى اللون فى السيقان إلى وجود نيكروزيس خاصة فى الأوعية الناقلة. ولذلك فإن اللون البنى أو الأسود دائمًا ما يوجدان على هيئة خطوط streaks ،كما فى كثير من أمراض التخطيط فى البسلة. وربما تصبح الساق سوداء اللون كلية، كما فى حالة اسوداد جذر الفاصوليا Black root of bean المتسبب عن فيروس موزايك البسلة.

جـ - تغير اللون فى الأزهار : Colour dviation in flowers

عرفت ظاهرة تغير اللون فى الأزهار من قديم الزمان، فوصف انفصال الألوان فى زهرة التيوليب Breaking of the flower colour بأول مرة عام ١٥٧٦م بواسطة كلوسيوس Clusios فى هولندا. وترجع هذه الظاهرة إلى غياب محلى أو تركيز وتجمع محلى للصبغات فى الطبقات السطحية للبتلات؛ إذ إنه فى حالة غياب الصبغات، يظهر العضو باللون الأبيض أو المصفر، ويسمى فى هذه الحالة انكسارًا خفيفًا Light breaking، أما فى حالة تركيز وتجميع الصبغات فيسمى انكسارًا قاتمًا dark breaking؛ حيث تظهر خطوط صغيرة أو طويلة قاتمة. وقد يوجد المظهران القاتم والفاتح مع بعضهما.

ويوجد انكسار اللون فى زهرة التيوليب المصابة بفيروس التيوليب رقم ١ ، كما أن الانكسار القاتم يمكن أن تسببه الإصابة بفيروس القرقعة .rattle V فى التيوليب، وربما ترجع أشكال الانكسار الخفيف إلى عوامل وراثية.

ويتسبب انكسار اللون فى زهرة التيوليب عندما تصاب أيضًا بفيروس اصفرار الفاصوليا Bean yellow V. أو فيروس موزايك الخيار CMV وكذلك يلاحظ فى أزهار المنثور Mathiola sp. عند إصابتها بفيروس النقط السوداء فى الكرنب.

ويوجد بجانب مظهر انكسار اللون فى الأزهار مظهر تغير اللون؛ إذ ربما يكون لون الأزهار ضعيفًا أو ثقيلاً أو يتغير كلية. فمثلاً عند إصابة زهرة الكريز انثيمم بسلالة من فيروس موزايك الخيار CMV يتحول لونها الأحمر أو البرونزى إلى البنى أوالأصفر. وربما تتحول أزهار البنفسج الحمراء أو الحمراء الخفيفة أو القرمزية إلى اللون الأبيض المنقط أو أبيض كامل.

وهناك تغير آخر فى اللون وفيه بدلاً من ظهور اللون الأخضر العادى على البتلات، فإنها تكون أكثر أو أقل خضرة، وهذه الحالة تعتبر أول خطوة من مجموعة من المتغيرات يطلق عليها anthalyses.

د - تغير اللون فى الثمار والبذور: **Colour deviations in fruits and seeds**

ربما يظهر تغير فى لون الثمار والبذور، ويرجع هذا إلى اضطراب فى الصبغات ولهذا المظهر أهمية اقتصادية كبيرة (وقد يجذب التغير فى ثمار الخيار صنف ghesking للتخليل الأنظار) وقد يوجد الموزايك مع تشوه فى الثمار. وربما تسبب بعض الفيروسات مثل فيروس موزايك الدخان، وفيروس ذبول الطماطم المنقط تغير لون ثمار الطماطم، وكذلك فإن البقع البنية على بذور الفول الصويا تتسبب عن الإصابة بفيروس موزايك فول الصويا.

٣ - الذبول والجفاف: Wilting and desiccation

فى أمراض النبات عامة دائمًا ما تظهر النباتات نقصًا فى محتوى الرطوبة، وهذا يؤدى إلى فقد فى حيوية النسيج وذبوله Wilting، وقد يكون فقداً كاملاً للرطوبة فيجف النسيج أو يحدث له تهالك، Withering، وقد يكون هذا مصحوبًا بانكماش وتساقط النسيج المصاب Withering and desiccation، ولا يكون هناك فرق فى بعض الإصابات بين الجفاف والتهالك، وقد يعود النسيج المصاب للتهالك Withering إلى طبقة، وربما يؤدى الذبول إلى

حالة تهالك Withering لا يعود بعدها النبات إلى طبيعته Irreversible ويعتبر مظهر التهالك Withering مظهراً عادياً للإصابة بالفيروس، ففي البسلة المصابة بفيروس اللون البني المبكر توجد هذه الحالة في الوريقات كنتيجة لوجود نيكروزيس العروق والأعناق petiols، أما مظهر الجفاف desiccation فربما يظهر على أجزاء معينة من الورقة، كما في حالة الفاصوليا المصابة بفيروس نيكروزيس الدخان؛ إذ ربما تظهر الأوراق نيكروزيس للعروق الرفيعة في مناطق مخصصة من النصل ينتج عنهاجفاف desiccation للأنسجة بين هذه العروق، وكذلك يلاحظ الجفاف في النقط المحلية Local lesions، كما يمثل مرض الوخز ecthing شكلاً خاصاً للجفاف.

ويعرف القليل عن سبب قلة الرطوبة في النباتات المريضة، وربما ترجع قلة وصول المياه للنسيج إلى وجود نيكروزيس في الأجزاء الوعائية أو تركيز مواد صبغية في الأوعية أو في الخلايا الخشبية الأخرى أو لوجود النموات الزائدة Tyloses في الخشب، وقد وجد هذا الاحتمال الأخير في نباتات العنب المصابة بفيروس Pierce's؛ إذ يسبب هذا المرض ذبولاً مفاجئًا للنباتات الصغيرة. ويبدأ الذبول من قمم الأفرع وينتشر إلى أسفل.

٤ - النيكروزيس (موت الأنسجة) : Necrosis

يسمى موت الخلايا أو موت الأنسجة نيكروزيس (Gr. neckrom = to make dead)، وهذا مظهر عام بالنسبة للأمراض الفيروسية، وهو يظهر بسرعة ويكون هناك خط واضح بين الجزء الميت والجزء الحي من النسيج، ويوضح النيكروزيس لونًا قاتمًا من المواد الشبيهة بالميلانين. وحيث إن مكان النيكروزيس وشكله مميزان، فإن هذا المظهر له قيمة تشخيصية وربما يؤثر النيكروزيس على الخلايا السطحية Superficial أو ربما يوجد في طبقات الأنسجة الداخلية وربما يشمل عديداً من الأنسجة أو يلتصق بنوع واحد. ويبدأ النيكروزيس غالبًا من مكان دخول الفيروس، ثم يتعدى إلى الخلايا المجاورة مسبباً نقطًا محلية نيكروزيسية.

وغير معروف ميكانيكية هذا النيكروزيس الشديد أى ميكانيكية مثل هذه الحساسية العالية Hepersensitivity التى غالبًا ما تؤدى إلى تحديد الإصابة وتمنع انتشارها داخل النبات.

هذه الحساسية يمكن أن تكون ذات أهمية عملية فى إيجاد أصناف مقاومة فى الحقل،

مثل الأصناف المقاومة لموزايك الفاصوليا العادى.

وفى ظروف الرطوبة العالية فإن النيكروزيس يتبعه العفن Rotting نتيجة لنمو الفطريات أو البكتريا، أما فى ظروف الجو الجاف فإن النسيج الميت ربما يجف فلا يصيبه العفن.

أ – نيكروزيس فى الأوراق : **Necrosis in leaves**

الإصابة النيكروزيسية إما محلية Necrotic spotting or necrotic speckling كما هى الحال فى نباتات *N. glutinosa* أو نباتات الفاصوليا عند إصابتها بفيروس موزايك الدخان TMV، وتكون فى بعض الأحوال الإصابة النيكروزيسية راجعة إلى تأثير عام Systemic، وهذا سببه حركة ومرور جزئيات فيروس معدية إلى مناطق مختلفة. وفى هذه الأحوال فإن النيكروزيس قد يكون سطحيًا ويسمى etching، ففى حالة اللون البرونزى فى الطماطم يكون النيكروزيس فى خلايا الطبقة السطحية epidermis، وعند اتساع عدد كبير من النقط الميتة فإنها تلتحم مسببة موت المنطقة، كما أن النقط الميتة ربما تتسع مسببة مظهر التخطيط Streaking كما فى حالةالبسلة، وربما النيكروزيس ويشمل العروق ويسمى نيكروزيس العروق veinal necrosis.

ب – نيكروزيس السيقان : **Stem necrosis**

بعد أن يصل النيكروزيس إلى العروق فإنه يستمر خلال الأعناق Petioles إلى الساق وبعد ذلك من الأوعية إلى الأوراق العليا. وغالبًا ما يؤدى هذا النيكروزيس إلى خلل فى نسبة الماء، وبالتالى إلى ذبول وسقوط الأوراق، وهذا واضح فى نباتات البسلة المصابة بفيروس اللون البنى المبكر early browning. ومن المظاهر المميزة لنيكروزيس الأوعية هو الجذر الأسود black root الذى يلاحظ فى بعض أصناف الفاصوليا المصابة بفيروس الموزايك العادى للفاصوليا، وفى هذه الأصناف يسكن الفيروس فى أماكن محدودة مسببًا نيكروزيس، وإذا ارتفعت الحرارة عن ٢٠ْم فإن الفيروس يصبح عامًا، ويسبب نيكروزيس الأوعية الناقلة فى كل أجزاء النبات مثل الجذور والسوق والقرون. ويحدث النيكروزيس، نفسه إصابة فى الأوعية، إذا أدخل الفيروس إلى الأوعية بواسطة التطعيم.

وطبيعيًا أن النيكروزيس العام يؤدى إلى موت الأفرع الصغيرة أو القمم النامية للسوق وهذا يحدث فى الفاصوليا عند الإصابة بسلالات خاصة من فيروس موزايك الفاصوليا الأصفر، أو فى بعض أصناف البطاطس بعد الإصابة بفيروس A أ البطاطس. وقد يسمى نيكروزيس القمة هذا acro necrosis .

وتوجد عدة اعتبارات خاصة بأصل ومكان النيكروزيس فى تشريح السيقان، ففى حالة الفيروسات التى تحدد وجودها فى اللحاء، فإن النيكروزيس عادة ما يكون فى اللحاء فقط والمثل الواضح لهذا هو نيكروزيس اللحاء، Phloem necrosis فى نباتات البطاطس المصابة بفيروس التفاف الأوراق، وهو يشمل الخلايا الغربالية والخلايا المرافقة، ويمكن ملاحظة هذا النيكروزيس بالميكروسكوب فقط. فى هذا المرض (نيكروزيس لحاء البطاطس) فإن النيكروزيس (فى بعض الحالات) يمتد إلى الدرنة، ويسبب نيكروزيس شبكيًا مثل net necrosis ومثالان آخران فيوجد نيكروزيس اللحاء فى بنجر السكر المصاب بفيروس تجعد القمة Curly top، والنجيليات المصابة بفيروس التقزم الأصفر للشعير Barley yellow dwarf ولنيكروزيس اللحاء أهمية خاصة فى بعض الأمراض كمرض التدهور السريع فى الموالح Tristeza؛ حيث يوجد مباشرة أسفل منطقة التطعيم فى النارنج Sower orange (أصل النارنج المطعوم بطعم من البرتقال المصاب) ويؤدى هذا النيكروزيس إلى حجز deple-tion النشا فى الجذور، وبالتالى تعفن هذه الجذور، وبالتبعية فإن الجزء من الشجرة خارج التربة يظهر تدهوراً عن جوع مستمر وذبول وتساقط الأوراق. ويسبب انتقال الفيروس خلال اللحاء وجود أشكال كثيرة من النيكروزيس فى اللحاء والحزم الوعائية، بل ويمتد النيكروزيس إلى أنسجة أخرى ففى مرض الجذر الأسود فى الفاصوليا السابق ذكره، فإن النيكروزيس لا يصيب فقط اللحاء، ولكن يصيب الكامبيوم والطبقة الخارجية من الخشب. وفى أمراض التخطيط Streak diseases فى البطاطس، والمتجمعة تحت اسم acro necro-sis، يبدأ ظهور النيكروزيس فى اللحاء، ثم يمتد إلى الأنسجة المجاورة فى جميع الاتجاهات؛ خاصة نحو الخشب، ودائمًا ما ترى بالعين أشكال النيكروزيس الداخلى كتخطيط لونه قاتم على السيقان وعنق الورقة والعروق الأساسية.

كذلك فإن أصل نيكروزيس الساق يكون فى القشرة (للخلايا البارانشيمية Parenchyma) ففى السيقان والورقة وفى العروق الأساسية للفاصوليا French bean المصابة بفيروس موزايك البرسيم الأبيض White clover M.V. فإن خلايا القشرة فى الكمبيوم الأولى Pericambium (وهو النسيج من اللحاء والقشرة Cortex أو بين الخشب) أو فى مجاميع الخلايا البارنشيمية بين الأوعية Intervascular parenchyma ربماتصاب بالنيكروزيس، ويسبق هذا النيكروزيس أو يصحبه ترسب الصمغ، ويظهر التخطيط من الخارج ذا لون رمادى قاتم.

وفى نباتات البطاطس المصابة بفيروس Y، فإن النيكروزيس يوجد فى Collenchema للأعضاء الهوائية، وفى بعض الأحوال يمتد إلى الأنسجة الأخرى من القشرة Cortex وليس للحزم الوعائية، وربما تصاب الخلايا البارنشيمية بين الحزم فى عنق الأوراق، ويرى التخطيط النيكروزيس من الخارج.

وتظهر قشرة سيقان الدخان المصاب بفيروس القرقعة Ratlle لنيكروزيس واضح. وبالإضافة إلى النيكروزيس الداخلى، فإنه يظهر على الساقة نيكروزيس سطحى خارجى ملتصق بالقشرة، مثل المناطق النيكروزيسية على الأوراق وأعناقها. فمثلاً يسبب مرض تبقع ساق البطاطس Stem mottle الذى يسببه فيروس القرقعة Rattle فى الدخان نيكروزيس سطحيًا يبدأ فى الورقة، ويتقدم إلى القشرة فى العروق والأعناق، ثم السيقان، دون أن يؤثر على الحزم الوعائية.

ويستعمل فى المراجع اصطلاح streak معبراً عن هذه الخطوط النيكروزيسية؛ إذ إن المعنى الحرفى لكلمة التخطيط هى كلمة stripe، ويمكن استعمالها (Stripe = shaped discol- ouration) كما تستعمل (stripe = shaped necrosis) وقد وصف نيكروزيس قلف شجر الدردار elm على أنه فيروس تحت اسم تقرح حلقى elm zonate cancer وفيه تظهر مظاهر الإصابة على القلف على هيئة حلقات متتالية من نسيج ميت وحى فى أنسجة القشرة أو اللحاء، ثم تتسع المساحة المصابة، وربما يمتد النيكروزيس إلى الخشب، كما ربما يسبب النيكروزيس انشقاق القلف.

ودائمًا ماتكون السيقان والأفرع متأثرة ويموت الجزء السطحى منها؛ إذ يؤدى

النيكروزيس المحدد فى السيقان والأفرع إلى موت القلف حتى الخشب، وهنا يستعمل اصطلاح تقرح canker لهذه الحالة، إلا أن اصطلاح نيكروزيس القلف bark necrosis ربما يكون أوضح.

ولا يعرف تعريف محدد لاصطلاح التقرح canker، وربما يؤدى النيكروزيس المحلى خاصة فيما يسمى تقرحات سنوية Perennial cankers إلى إنتاج درنات من الكالوس tumorous callus حول الجرح، ولهذا فالظاهرة لها عدة أوجه، وربما تسمى tumorous canker.

وفى بعض أمراض النباتات فإن التقرحات cankers ربما يطلق عليها انثراكنوز القلف bark anthracnose (Cr. antheax = cool, nosos = disease)، وعموماً فإن الانثر اكنوز هو اسم مرض يتميز بأجزاء تشبه القرحات ulcer .

وربما تظهر درنات البطاطس مجموعة من أشكال النيكروزيس، ففى مرض corky ring spot dis البقع الحلقية الفلينية المتسبب عن فيروس له علاقة بفيروس تبقع ساق الدخان (tobacco rattle)، فإن السطح الخارجى المقطوع من الدرنة يظهر نظام نيكروزيس يشبه الحلقة أو القوس (ring = linke or arc)، وهذا شكل من أشكال الحلقات النيكروزيسية. وحيث إن مظاهرالإصابة تكون مصحوبة بتكوين بعض الفلين.. فإن هذا يؤدى إلى استعمال اصطلاح الحلقات الفلينية Corky ring spot للمرض.

وفى مظهر الحلقات الفلينية يمكن التمييز بين الإصابة الأولية والإصابة الثانوية حسب وضعها فى الدرنة؛ فالإصابة الأولية تبدأ من مركز الدرنة متجهة إلى حوافها، بينما تتركز الإصابة الثانوية حول طرف الدرنة heel-end .

وتظهر درنات أصناف البطاطس خاصة المنزرعة فى أمريكا الشمالية نيكروزيس شبكيًّا، بعد إصابتها بفيروس التفاف الأوراق، ويظهر على النسيج تحت سطح الدرنة علامات بنية قائمة وأشكال شبكية، والتى تتكون من نيكروزيس الخلايا الغربالية والخلايا المرافقة، وهذا هو نيكروزيس اللحاء، ويسبب عدم انتظام توزيع الحزم الوعائية فى الدرنة يظهر السطح

المقطوع علامات تشبه الشبكة. هذا النيكروزيس واضح للعين المجردة، كما يظهرتبقع الدرنة tuber blotching أو النيكروزيس الشبكى الكاذب pseudo net necrosis الذى غالبًا ما يوجد فى الخلايا البارنشيمية للقشرة والنخاع فى الدرنة، متسببًا عن الإصابة بفيروس أوكيوبا البطاطس aucuba، ويرى النيكروزيس بسهولة كبقع صدئة بنية قاتمة داخل و خارج حلقة الأوعية الناقلة.

وهناك فرق بين نكيروزيس الدرنات المتسبب عن فيروس، وبين المتسبب عن طبيعة فسيولوجية؛ إذ إن الثانى يكون أخف مظهراً ولونًا.

جـ - نيكروزيس الثمار: Necrosis in fruits

ربما يوجد النيكروزيس أيضًا فى الثمار، ودائمًا ما تظهر قرون الفاصوليا المصابة بفيروس نيكروزيس الدخان وقرون البسلة المصابة بفيروس اللون البنى نظامًا حلقيًا نيكروزى. ومثل آخر لنيكروزيس الحلقى هو ما يظهر على ثمار الطماطم المصابة بفيروس الذبول المنقط .spotted wilt V، وفى الكمثرى فإن الثمار المصابة بفيروس الحفر الحجرية stony-pit يوجد فيها نيكروزيس فى القلب بجانب تركيز وتجميع الحفر الحجرية sclerenchyma.

٥ - تكوين الفلين: Cork formation

يعتبر تكوين الفلين ظاهرة عادية فى النباتات، كما يوجد أيضًا فى حالة النباتات المصابة ودائمًا ما يكون ظاهرة ثانوية ناتجة عن الجروح، وعادة ما يوجد تكوين الفلين فى الأمراض الفيروسية، وفى هذه الحالة تتكون خلايا تنقسم مكونة خلايا الفلين. هذا التغير هو تغير تنظيمى. ويتكون الفلين فى طبقات متتالية على الجذور مثلاً أو على المسافات بين الخلايا والمملوءة بالصموغ، أو حول المجاميع الكبيرة من الخلايا الميتة.

وفى مرض القوباء فى الموالح.. فإن وجود الفلين يكون فى طبقات قلف السيقان الخارجية المتمزقة التى تموت، وتكون القشور الجافة، ويسمى هذا المظهر قشور القلف bark scaling باسم سوروسيس psorosis من L: psora - scab.

يوجد أيضاً مظهر لتكوين الفلين على ثمار التفاح المصابة بفيروس Apple rough skin القشرة الخشنة، وتنتج ظاهرة القشر الخشن عن بقع فلينية خشنة على جلد ثمار التفاح. ربما تكون هذه الأجزاء صغيرة ومستديرة، وربما توجد أيضاً فى حلقات أو خطوط طولية، وربما تشمل أجزاءً كبيرة من الجلد. وفى بعض الأحوال تتشقق هذه المناطق الخشنة، وتظهر الثمار بعض التشوهات، وربما تأخذ التشققات شكل النجمة فتسمى التشقق النجمى star cracking .

٦ - التشوهات : Malformation

فى كثير من الأمراض الفيروسية حيث تظهر الخلايا طبيعية، إلا أنه قد تكون الخلايا والأنسجة وحتى الأعضاء فى نموها غير طبيعية، وهذا النمو غير الطبيعى يؤدى إلى تشوهات Malformation أو تغيرات deviations فى بناء وتكوين أجزاء النبات أو ربما النبات بأكمله.

ومجوعة التشوهات مجموعة معاندة، وربما تدخل تحتها التغيرات السيتولوچية غير الطبيعية حيث إن التفرقة بين مجموعة التشوهات ومجاميع الإصابة السابقة غير مقبولة تماماً.

وربما تكون التشوهات أولية أو ثانوية ففى الحالة الأولى (أولية) فإنها تكون المظاهر المرئية التى تتسبب مباشرة من الإصابة، أما التشوهات الثانوية لا تظهر إلى أن يظهر النبات مظاهر معينة مثل النيكروزيس، أو البقع الصفراء التى قد تؤدى إلى تشوه العضو المذكور.. فإن هذه ترجع بطريق غير مباشر إلى الإصابة الفيروسية.

أ - التشوهات الأولية : Primary malformations

تعتبر التشوهات الأولية من بين التغيرات الأولى الناتجة عن الإصابة الفيروسية، وترجع إلى العمل غير المنتظم للهرمونات النباتية (الناتجة عن الانتقال والتوزيع غير المنتظم للهرمونات) أو من نقص أو زيادة فى المستوى الهرمونى. وحيث إن المستوى المطلوب لنمو نموذجى يتغير بتغير الأجزاء النباتية، فإن التغير فى مستوى الهرمون ربما يعرقل صفات النمو. ويمكن تقسيم التشوهات التى تظهر نتيجة لهذه الحالة إلى مجموعتين (وذلك طبقاً لما قام به Kister عام ١٩١١، ١٩٢٥).

المجموعة الأولى: تشوهات فى الأنسجة:

Histoid or histological deviations (histoid = tissue like)

وتتسبب عن تنظيم غير عادى لأنسجة معينة أو لأنسجة داخل أعضاء معينة.

المجموعة الثانية: تشوهات فى الأعضاء:

Organoid or morphological deviations (organoid= organ - like)

وفيها تكون الأنسجة والأعضاء عادية، ولكن تنظيم أو ترتيب الأعضاء أى العلاقة بين الأعضاء غير طبيعية.

وتعتبر صفات Organoid, histoid من أن النواتج غير العادية تكون إهليليًّا بالنسبة للأنسجة tissue like أو بالنسبة للعضو Organ like ، ويجب أن يوضع فى الذهن أنه لايوجد خط فاصل واضح بين تغيرات الأنسجة histoid وتغيرات العضو Organoid ، ويستعمل فى مثل هذه الحالات (حالات النمو الشاذة) اصطلاح proliferation (L. Proless = offspring or sprout) (L. Fero = to bear) كما يطلق أيضاً اصطلاح hyperplasia على النمو غير المحدود أو الزيادة غير المحدودة للأنسجة والأعضاء.

ويطلق اصطلاح Histoid enations على النمو الزائد للأنسجة وهى نموات عادية، محدودة الحجم مثل النمو الزائد، الذى يكون ملتصقاً بالعرق الوسطى الرئيسى والعروق الجانبية، وهناك نموات أخرى مميزة هى التى توجد على عروق أوراق الموالح كنتيجة للإصابة بفيروس نموات العروق Citrus vein - enation .

وكذلك الخطوط الطولية أو الانتفاخات على الأوراق مثل التى تنشأ نتيجة للإصابة بفيروس موزايك النرجس narcissus m وفيروس مرض فيجى قصب السكر، وفيروس تقزم الذرة. فالخطوط والانتفاخات التى تظهر على السطح العلوى لورقة النرجس المصابة بالتخطيط ترجع إلى زيادة فى الخطوط Hyperteophy أو فى العدد Hyperplasia بالنسبة للخلايا العادية palisade cells ، ويشبه هذا ما يحدث فى بعض النباتات نتيجة لزيادة الرطوبة. والزوائد التى تظهر على السطح السفلى لأوراق قصب السكر المصاب بمرض فيجى تكون نتيجة لتشوه فى اللحاء أو النسيج الملاصق له، ولذلك فهى تمتد بطول السطح أسفل

العروق، وكذلك الحال فى مرض تقزم الذرة. وليس هناك حد فاصل بين هذه الزوائد بين التدرنات tumours، إلا أن التدرنات أقل حجماً من الزوائد، وناتجة عن شذوذ غير عادى للخلايا والأنسجة. والتدرنات هى نموات شاذة دون أى نظام، ولها أوجه وأشكال عدة، ويختلف أصل وطبيعة التدرنات باختلاف الفيروس المسبب، والنباتات العائل والجزء المصاب من النبات. وعادة ما تكون الانتفاخات الدرنية التى توجد على الأوراق صغيرة الحجم مثل التدرنات التى توجد على السطح السفلى لعروق ورقة البرسيم القرمزى Crimson clover الناجمة عن التدرن الجرحى wound tumour V.، وتشبه إلى حد ما الزوائد، ولقد درست التدرنات الناتجة عن فيروس التدرن الجرحى للبرسيم الحلو (*Mililotus alba* and *M.officinalis*, Sweet clover) بشكل أوسع، وكذلك التى على جذور السيسل sessel (*Rumex acetosa*)، وعدد آخر من أنواع النباتات، وقد وجد أنه ربما تصل تدرنات الساق إلى قطر حوالى ١سم، وهذه توجد على النباتات المصابة إصابة عامة، وتنشأ التدرنات فى البريسيكل فى الخلايا الملاصقة للخلايا المجروحة، وتتكون حتى على قاعدة العقد البكتيرية والتدرنات الخشبية على النباتات الصغيرة لليمون المخرفش rough lemon وعلى أشجار الليمون الهندى west indian، التى اكتشفت حديثاً مع وجود فيروس نموات العروق الزائدة. وربما توجد النموات الزائدة Nistoids على الثمار، كما فى مرض الخوخ. wart dis.، وترتفع هذه التدرنات على سطح الثمار، وتشمل نصف أو أكثر من نصف الثمرة وتكون القشرة خشنة الملمس ممتلئة بجيوب صمغية، وفى بعض الحالات يتصلب النسيج المتناثر.

وتنتج كثير من الفيروسات نموات زائدة وتدرنات تشبه الانتفاخات الناتجة عن الكائنات المتطفلة كالحشرات والنيماتودا والبكتريا. ويجب التفرقة بين التدرنات الناتجة عن الفيروسات والانتفاخات الناتجة عن الكائنات الطفيلية، التى تظهر كتدرنات galls، والتى تؤدى إلى دخول اصطلاح galls فى علم الفيرولوجى، ويعتبر لفظ gall غير دقيق تماماً.

وكذلك تظهر انتفاخات على سيقان الكريز صنف نابليون فى ولاية أورجون Oregon بالولايات المتحدة؛ نتيجة للإصابة بفيروس التقرحات السوداء فى الكريز؛ حيث تظهر أولاً مناطق منتفخة، والتى تتشقق فيما بعد وتنمو إلى تقرحات سوداء. ومرض فيروس آخر

Prune diamond canker وهو يشبه السابق حيث إن الانتفاخات فيه أساساً تدرنات، ولابد أن يؤخذ فى الاعتبار أن اصطلاح التقرح Canker ينسب إلى نيكروزيس محدود فى قشرة السيقان الخشبية، حيث يظهر النيكروزيس كمظهر ثانوى، رغم أن نيكروزيس التقرحات يكون أساسياً أوليًا، وبعد وقت يظهر إنتاج الكالوس حول الجرح؛ خاصة فيما يسمى Perennial cankers ، ويطلق فى بعض البلدان اصطلاح التقرحات على التقرح والسرطان معاً Canker and cancer كما هو فى هولندا، ولكن اصطلاح السرطان cancer يستعمل فقط فى علم الطب، ولهذا يقترح أن هذه التغيرات التشبيهة بالسرطان Canker like abnormalities التى تحتوى نيكروزيس تسمى Necrosis tumours ، أما إذا كان تكوين الكالوس ثانوياً فتسمى tumorous cankers .

ربما تنتفخ أفرع سيقان بأكملها معطية مظهر إصابة، يسمى انتفاخ الأفرع Shoot ، والمثل على ذلك هو مرض الفرع المتضخمة swollen shoot فى الكاكاو فى غرب أفريقيا، وقد تظهر السرطانات الناشئة من أسفل الساق انتفاخاً تسبب لها زيادة فى القطر، قد يصل إلى ضعف القطر الأصلى، وهذه ربما تكون فى العقد، أو بين عقد ولكنها دائماً طرفية terminal، وترجع الانتفاخات إلى زيادة فى نسيج الخشب كما يحدث تشوه بسيط لنسيج اللحاء.

تعتبر التغيرات فى شكل الأوراق مظهراً عاديًا بالنسبة للأمراض الفيروسية، ورغم أن هذه الحالات تؤثر على سلوك ونمو الأوراق، إلا أنه من الصعب وضعها فى اصطلاحات مورفولوچية، يمكن إرجاع معظمها إلى عدم اتزان فى النمو فى العروق والنسيج بين العروق.

النقص فى نمو نسيج النصل يؤدى إلى ضيق النصل Leaf narrowing ، كما فى حالة مرض الكريز؛ حيث يصحب التشوه بضيق طرف الورقة بشكل ظاهر، أو فى الترمس الأصفر فى حالة مرض موزايك الترمس. مثل آخر هو مرض الورقة الضيقة فى الطماطم المتسبب عن الإصابة بفيروس موزايك الدخان أو موزايك الخيار. وربما تصل وريقات الطماطم المصابة إلى الشكل الريشى fern leaf ، وربما يغيب النصل ولا يبقى إلا العرق الوسطى، وهذه الحالة تسمى shoe stringing وأحياناً يصل إلى الشكل المروحى فى العنب Fan Leaf ، عندما يصبح النقص غائراً وتتجمع عروق الورقة الخامسة بالقرب من القاعدة. وعلى العكس فربما

يحدث تشوه فى الأوراق نتيجة الزيادة فى نمو النسيج بين العروق، ويؤدى هذا إلى سطح مجعد للورقة bubbled surface، كما فى حالة تجعد ورق الدخان، والذى يسمى rugosity وفى حالة وجود خطوط furrowing أو تجعد wrinkling النصل، تستعمل اصطلاحات curling crinkling ، كما فى حالة Sugarbeet leafcurl, turnip crinkle ، ومن الصعب التفرقة بين curling, crinkling رغم أنه curling. احتمال آخر للنموات غير المتوازية هو نقص العنق والعرق الوسطى للورقة، وهذا واضح فى مرض Potato bouguer dis. ، وهذه الحالة تؤدى إلى تزاحم الوريقات وتجعدها حول العرق الوسطى من أسفل.

وهناك ظاهرة شائعة فى الأمراض الفيروسية وهى ظاهرة Epinsaty

(Gr. epi = on, upon : nastos - pressed close)

وهى عبارة عن زيادة فى نمو السطح العلوى للعضو مثل نصل الورقة، وهذا يؤدى إلى تجعد سفلى للورقة كلها، وقد يؤدى إلى تجعد علوى Upward curling وقد يسمى المظهران Leaf rolling.

ومظهر زيادة نمو الأذنات hypertrophy of spitules فى أوراق التفاح المصابة بفيروس مكنسة العجوز، وهذا مظهر مهم فى التشخيص.

وهناك تغير آخر يؤثر على طبيعة نمو النبات، وهو تساقط الأوراق قبل نضجها (Leaf abscision, leaf casting, defoliation). وهذه ظاهرة دائماً ما تقابل فى الأمراض الفيروسية ومثلها مرض اصفرار الكريز، وفيه تبدأ بالأوراق الكبيرة ثم تمتد للأصغر، وربما تتساقط الأوراق قبل ظهور أى كلوروسيس، وربما يصل التساقط إلى ٥٠٪ من الأوراق.

وكذلك فيروس Y البطاطس، وهنا يكون تساقط الأوراق leaf dropping متبوعاً بالذبول أو التدنى withering، ويمكن أن توصف النموات الزائدة فى الأوراق على أنها organoid أى تغير عضوى؛ لأنها تمس التركيب الداخلى للورقة. وهذه النموات غالباً ما تنمو على السطح السفلى، وتصحبها دائماً مناطق صفراء، وهذه النموات تشبه الأوراق فى تركيبها، فلها طبقة سطحية أبيدرمس وخلايا عمادية وأسفنجية وأبيدرمس سفلى.

وقد تكون هذه النموات على شكل فنجان cup - like حول الجزء الأصغر فى حالة إصابة

فيروس موزيك الدخان لنباتات دخان *N. poniculata, N. tomentosa* ، وكذلك فى نباتات البسلة والفول البلدى بعد إصابتها بفيروس النموات الزائدة فى البسلة PEMV ، وقد تختلف أشكال النموات، فتكون على هيئة جناح wing أو فنجان أو مركب boat أو قمع funnel إلى شكل محارة Shell - like، وربما يتسبب التغير المورفولوجى فى الساق عن اختزال فى النموات. وقد تؤدى الإصابة بالفيروس إلى قصر فى السلاميات، كما هو الحال فى أفرع العنب، والتى قد تصل إلى حالة من القصر بحيث تصبح العقدتان متلاصقتين، وتسمى هذه الحالة double nodes ، وفى هذه الحالة تتزاحم الأوراق rosette، كما هو فى حالة تزاحم أوراق الفول السودانى.

تغير آخر مورفولوجى فى الساق وهو النمو المتعرج zigzag ، كما فى حالة العنب المصاب بفيروس الورق المروحى. وهذه تعتبر ظاهرة مميزة، عندما تتساقط الأوراق شتاء. وربما تحدث نموات درنية هوائية aerial tuber عند إصابة نباتات البطاطس بفيروس ستلبور أو فيروس مكنسة العجوز witches, broom ، وهناك تغير مورفولوجى على الثمار، وهو ما يحدث لثمار الداتورا نتيجة للإصابة بفيروس T. etch حيث يقف نمو الأشواك على الثمار.

وتعتبر ظاهرة مكنسة العفريت witches, broom من التغيرات المورفولوجية، وهذه الظاهرة تكون نتيجة لتغيرات فى النمو الخضرى والزهرى. ومن الأمثلة اخضرار البرسيم clover virescene وتضخم برعم الطماطم tomato big bud ستلبور.

وتعتمد مظاهر الإصابة على طور نمو النبات عند الإصابة ولحد ما إلى نوع النبات. وأحياناً ما تؤدى ظاهرة مكنسة العفريت إلى أن تنمو البراعم الزهرية إلى أجزاء خضرية، وتسمى هذه الحالة anthalses.

.(Gr. anthos - flower, lysis - desintegration, solution)

وتميز هذه الظاهرة مرض الاخضرار فى الطماطم، وهو مرادف لمرض تضخم البرعم. وعندما تتحول الأجزاء الزهرية إلى نموات خضرية فى المراحل الأخيرة من anthalyses ، تسمى هذه الظاهرة Phyllody (Gr. Phyllon = leaf)؛ أى تورق الأزهار.

أما اصطلاح proliferation فيعبر عن نموات خضرية من زوايا البراعم الزهرية، وتؤدى

كل أمراض فيروس مكنسة العجوز التى درست إلى نموات مكنسة العجوز، كما تؤدى إلى ظهور درنات صغيرة، وقد تكون هوائية كما فى البطاطس.

ب - التشوهات الثانوية : **Secondary malformation**

وهى تشوهات ترجع إلى سبب آخر، والتى تتسبب أساساً عن الإصابة الفيروسية الكاملة، وهذه قد تؤثر على الشكل الخارجى للنباتات المصابة، دون التمييز بين أن تكون عضوية أو نسيجية.

ودائماً ما تكون الأوراق الملونة أقل حيوية، كما أن الأوراق التى بها موزايك ربما يؤدى هذا المظهر إلى تغيرات داخلية تسبب أشكالاً، لا يمكن وصفها مورفولوجياً مثل تأثير فيروس موزايك الدخان على أوراق الدخان، أو فيروس موزايك الفاصوليا على الفاصوليا الفرنساوى French bean ؛ حيث توجد المناطق القاتمة على جانبى العرق الوسطى وتنتشر بسرعة.

ويوجد مثل آخر لانتشار هذا الموزايك مثل موزايك الخيار، وما يؤديه من تجعدات rugosity, crinkling, curling نتيجة لنقص فى سرعة النمو لنسيج العروق.

هذا التغير يختلف شكلاً عن التغير الأول فى شدته وعدم انتظامه.

العوامل التى تؤثر على أعراض أمراض الإصابة الفيروسية:

من العوامل المهمة التى تحدد دراسة أمراض النباتات الفيروسية، هو تدخل الظروف البيئية فى شكل الأعراض التى يعطيها النبات المصاب بتلك الأمراض، فعند وصف أعراض أحد الأمراض الفيروسية يجب تحديد الظروف البيئية التى ينمو فيها العائل؛ حيث إن تلك الظروف تغير من تفاعل النبات لوجود الفيروس فى خلاياه، وبالتالى الأعراض التى تظهر على العائل. وعلى العموم لا يمكن وضع أسس عامة للاختلافات التى تحدث فى الأعراض من جراء اختلاف العوامل البيئية، إلا أن معظم أعراض الأمراض الفيروسية تأخذ وقتاً أقل فى الظهور بزيادة درجة الحرارة والضوء.

١ - تأثير الحرارة والضوء على الأعراض:

من المعروف أن معظم الفيروسات التى تسبب عرض تبرقش الأوراق، يكون تأثيرها

واضحًا جداً خلال شهور الشتاء، وبمعنى آخر أن عرض التبرقش يكون واضحاً فى خلال الشتاء عنه فى خلال الصيف، وقد وجد أن عامل الحرارة هو المحدد؛ لذلك فنجد أعراض التبرقش التى تنشأ عن إصابة نباتات الدخان بفيروس التبرقش تقل حدتها تدريجيًا بارتفاع درجة الحرارة، إلى أن تختفى تقريباً عندما ينمو النبات المصاب على درجة حرارة ٣٥ْم، وإذا وضع النبات على الظروف العادية ثانية.. فإن الأعراض تظهر ثانية بوضوح. أما إذا ارتفعت درجة الحرارة إلى ٣٧ْم لمدة ١٠ أيام.. فإننا نحصل على سلالة من فيروس تبرقش الدخان تعطى تبرقشاً خفيفاً جداً، حتى ولو وضعت النباتات ثانية تحت درجة حرارة منخفضة. كذلك وجد أن تلك الأعراض تختفى عندما ينمو النبات تحت درجة حرارة أقل من ٧ْم.

كذلك وجد أن أعراض التبرقش التى يحدثها فيروس تبرقش البطاطس (فيروس X) تختفى تماماً عندما تزيد درجة الحرارة عن ٢٤ْم.

ومن الأعراض التى تتأثر بارتفاع الحرارة هو عرض النقط الميتة Local lesions ، فنجد أن النقط الميتة التى يسببها فيروس تبرقش الدخان على أوراق نباتات *N. glutinosa* تكبر فى المساحة، وتنتشر بسرعة على سطح الورقة، بدلاً من أن تكون محددة، كلما ازدادت الحرارة إلى أن تصل إلى درجة ٣٥ْم؛ حيث إنه بتلقيح النباتات بالفيروس ووضعها تحت تلك الدرجة أو أعلى منها فإن الأعراض التى تظهر على الأوراق الملقحة تكون عبارة عن مساحات صفراء Blotches ، ويتبع ذلك انتقال الفيروس إلى جميع أنسجة النبات، بدلاً من أن يكون محدوداً فى النقط الميتة.

وبالعكس نجد أن الفيروسات التى تسبب تجمع الكربوهيدرات فى أوراق النباتات التى تصاب بها، تكون أعراضها فى الغالب أشد جداً خلال شهور الصيف عنها خلال شهور الشتاء، وهذا يرجع إلى شدة الضوء التى تتعرض له النباتات، فنجد أن فيروس التفاف أوراق البطاطس Potato leaf roll virus يسبب التفافاً شديداً فى أوراق النباتات المصابة خلال شهور الصيف، ولكن لا تظهر تلك الأعراض بوضوح خلال شهور الشتاء، وبالمثل فيروس إصفرار بنجر السكر Sugar beet yellows virus ، وفيروس انحناء قمة بنجر السكر Sugar beet curly top virus.

ولقد وجد أن سرعة تكوين النقط الميتة التى يحدثها فيروس تبرقش الدخان على أوراق نباتات *N. glutinosa* عندما تكون النباتات نامية تحت درجة حرارة ١٥ْم تكون حوالى ٥٠٪ من سرعة تكوينها، عندما تكون النباتات نامية على درجة حرارة ٢٠ْم.

ولقد ذكرنا من قبل أن حلقات **Ringspots** التى تسببها بعض الفيروسات تظهر خلال الشتاء، ولكنها تختفى، وتحل محلها أعراض تبرقش خلال الصيف. فنجد أن فيروس الحلقات الذى يصيب الدخان **Tobacco ringspot virus** يحدث نقطًا ميتة على جميع أجزاء النباتات المصابة إذا وضعت النباتات فى الظلام، مما ينتج عنه موت النباتات، أما إذا وضعت النباتات فى مكان مظلل فإننا نجد أن حلقات كثيرة تتكون داخل بعضها على الأوراق، ويفصل بينها أنسجة خضراء حية. أما إذا وضعت النباتات تحت الظروف الطبيعية فإن الحلقات التى تظهر على الأوراق، تكون كبيرة الحجم وقليلة العدد.

٢ - ظروف النباتات وقت حدوث الإصابة:

تزداد أعراض الأمراض الفيروسية وضوحاً كلما كانت ظروف نمو النباتات مناسبة وعادة ما تزيد مقاومة النبات للإصابة بزيادة عمر النبات، وإذا ما حدثت العدوى فإن الزيادة فى مستوى الآزوت يؤثر فى مظاهر الإصابة، فتكون أكثر وضوحاً كما هو الحال فى مرض تقزم وإصفرار البصل ومرض موزايك الطماطم. ووجد أن الزيادة فى سرعة النمو للنباتات المصابة غالباً ما تقلل من حدة مظاهر الإصابة الخارجية. كما وجد أن زيادة بعض العناصر عادة ما يقلل من شدة الإصابة، وغالبًا ما يساعد على تخفى مظاهر الإصابة (Mask) فمثلاً تقل حدة مظاهر إصابة الدخان بالموزايك فى حالة زيادة التسميد بالفوسفور وبالبوتاسيوم.

٣ - تأثير الضوء على حساسية النبات للعدوى بالفيروس:

وجد أن تقليل الضوء قد يزيد حساسية النبات للعدوى ببعض الفيروسات، فنجد أن عدد النقط المميتة التى تظهر على أوراق نباتات *N. glutinosa* التى عرضت للظلام لمدة يتراوح ما بين ٢٤ - ٧٢ ساعة قبل التلقيح بفيروس موزايك الدخان، تكون أكثر بكثير من عدد النقط الميتة التى تظهر على أوراق تلك النباتات، إذا لم تعرض للظلام قبل التلقيح.

٤ - تأثير الحرارة على الفيروس فى الأنسجة:

عند تعرض بعض النباتات المصابة بأمراض فيروسية لدرجات حرارة مرتفعة.. فإن أعراض تلك الأمراض تختفى بسبب موت الفيروس داخل الأنسجة، فنجد أن نباتات الخوخ المصابة بفيروس الاصفرار Yellows والتورد Rosette تصبح خالية من تلك الفيروسات، إذا نمت على درجة حرارة ٣٥ْم.

٥ - الأصناف:

قد تختلف الأعراض التى يسببها فيروس ما اختلافاً شاسعاً باختلاف الأصناف، فنجد مثلاً الأعراض التى تظهر على شتلات الليمون البلدى المصابة بفيروس التدهور السريع Tristeza virus، هى عبارة عن اصفرار متقطع فى عروق الورقة، وظهور تنقرات Pits فى خشب الشتلات. ومثل تلك الأعراض لا تظهر على الأصناف الأخرى من الليمون.

٦ - سلالات الفيروس:

كذلك تختلف أعراض الفيروس الواحد باختلاف سلالاته، فنجد أن فيروس تبرقش الدخان له عدة سلالات، كل سلالة منها تسبب أعراضاً مختلفة تماماً عن أعراض السلالة الأخرى، فبعضها يعطى تبرقشاً أصفر، والآخر تبرقشًا خفيفًا وثالثاً يعطى أعراضًا محددة حول العروق Vein banding وهكذا. وإذا لقح نبات الدخان بإحدى تلك السلالات أولاً، ثم لقح النبات ثانية بسلالة أخرى.. فإن الأعراض التى تظهر هى أعراض السلالة الأولى؛ حيث إنها تمنع السلالة الثانية من التكاثر فى النبات، وهذه الظاهرة تعرف بالوقاية بالتضاد Cross Protection.

٧ - وجود فيروس آخر فى العائل:

إذا وجدت سلالة من الفيروس نفسه داخل النبات.. فإنه عادة ما تحصل حماية له من الإصابة بأى سلالة أخرى للفيروس نفسه، أما إذا وجد فيروس من نوع آخر داخل النبات فربما تحصل مظاهر إصابة إضافية أكثر شدة من المظاهر الناتجة من فيروس واحد، كما هو الحال عند إصابة الطماطم بفيروس موزايك الدخان، وفيروس X البطاطس (Synergism).

الباب السابع

إنتاج الأمصال المضادة والتشخيص السيرولوجى لفيروسات النبات

Production of Antisera and Serological Diagnosis of Plant Viruses

إنتاج الأمصال المضادة والتشخيص السيرولوچى لفيروسات النبات

Production of Antisera and Serological Diagnosis of Plant Viruses

الفصل الأول

الانتيجينات والأمصال المضادة

Antigens and Antibodis

عندما تحقن الفيروسات النباتية فى الحيوانات ذوات الدم الحار، فإنها تشجع على تكوين بروتين متخصص فى مصل دم هذه الحيوانات، يطلق عليه اسم الأجسام المضادة Antibodies أو أميونوجلوبولين، وهذه الأجسام المضادة تسبح فى الدورة الدموية، ولها القدرة على الاتحاد مع الفيروسات النباتية التى شجعت على تكوينها (الإنتيجين)، وقد كان Dvorak سنة ١٩٢٧ أول من نبه إلى أن الفيروسات النباتية تملك خاصية الإنتيجينية.

ويعتبر تفاعل الأجسام المضادة مع الفيروسات النباتية الكاملة أو مكوناتها على جانب كبير من الأهمية فى الكشف عن الفيروسات النباتية Detection of Plant Viruses وتشخيص مسببات الأمراض الفيروسية Diagnosis، وفى التقديرات الكمية للفيروسات وكذا فى تقسيم الفيروسات، ويعتبر هذا التفاعل أساس علم السيرولوچى Serology .

الإنتيجينات : Antigens

يعرف الإنتيجين بأنه المادة التى لها القدرة على تنشيط أو تنبيه عملية تكوين الأجسام المضادة فى دم الحيوانات ذات الدم الحار، والتى لها القدرة على التفاعل أو الاتحاد مع هذه الأجسام المضادة عند خلطهما معاً خارج جسم الحيوان **Invitro**.

وهناك خاصيتان يتميز بها الإنتيجين أولهما أنه يكون قادراً على تنشيط تكوين الأجسام

المضادة فى دم الحيوان المحقون به، وتسمى هذه الخاصة بالقدرة المناعية Immunogenicity.

أما الخاصية الثانية فهى قدرة هذه الإنتيجينات على الاتحاد مع الأجسام المضادة، وتشير هذه الخاصة إلى القدرة الإنتيجينة للمادة Antigenicity ، وتكون الجزيئات الكبيرة أكثر قدرة مناعية عن الجزيئات الصغيرة، وحيث إن الفيروسات النباتية عبارة عن جزيئات كبيرة تحتوى على البروتين فإنها تعتبر ذات قدرة عالية على تنشيط تكوين الأجسام المضادة عند حقنها بصورتها الكاملة، فى حين تكون الوحدات البنائية Portein subunit للكابسيد أقل كفاءة فى ذلك.

الخصائص العامة للأنتيجينات :

يمكن التأكد من أن مادة ما لها صفة الأنتيجينية عن طريق حقنها فى حيوان التجارب مثل الأرانب أو الفئران أو خنازير غينيا أو الخيول، ثم فصل سيرم الدم وخلطه مع هذه المادة بوسيلة أو بأخرى من وسائل الكشف السيرولوجى فإذا كان التفاعل إيجابيًّا كانت المادة أنتيجيناً.

وقد أشار لاندستينر Landsteiner أن هناك بعض المواد التى ليس لها قدرة مناعية، أى لا تنشط تكوين الأجسام المضادة فى دم الحيوان، ولكن لها القدرة على التفاعل مع الأجسام المضادة Invitro وأطلق على هذه المواد اسم Haptens أو الهابتينات. وقد وجد لاندستينر أن بعض الليبيدات والسكريات العديدة تسلك مثل هذا السلوك، واستلزم الأمر مزيداً من الدراسة لتحديد مفهوم الهابتينات.

فقد أطلق Topley & Wilson اصطلاح الهابتينات المركبة Complex Haptens على المواد التى تتحد بالأخص مع الأجسام المضادة المتخصصة مكونة راسباً مرئيًّا، دون أن تكون لها القدرة على تنشيط تكوين مثل هذه الأجسام. على سبيل المثال عند حقن الأرانب بمستخلص كحولى لكلية خنزير غينيا، لا تتكون أجسام مضادة، ولكنها تتفاعل مع الأجسام المضادة المستخلصة من أرنب محقون بمستخلص كلية الخنزير فى محلول ملحى.

كما أطلق اسم الهابتينات البسيطة Simple haptens على المواد التى ليس لها القدرة على تنشيط تكوين الأجسام المضادة عند حقنها فى دم الحيوان، وكذا لا تعطى تفاعلاً مرئيًّا

عند خلطها بالمصل المتخصص، ولكنها تتحد مع هذه الأجسام المضادة، وتمنع تفاعلها مع الأنتيجين الكامل، الذى أدى إلى ظهورها، فعلى سبيل المثال فعند التحليل المائى للسكريات العديدة المستخلصة من البكتريا pneumococcal يتجمع مركب عند خلطه مع المصل المضاد للسكر العديد من هذه البكتريا، أخفق فى تكوين راسب يمكن رؤيته، ولكن هذا المركب منع تكوين راسب أيضاً عند خلط السكر العديد مع المصل المضاد له، ويطلق على هذا الاختبار اسم اختبار التثبيط Inhibition Test .

وغالباً ما تكون الهابتينات البسيطة عبارة عن جزيئات صغيرة مثل حمض الطرطريك Tartaric Acid أو حمض البنزويك benzoic .

ولقد أوضحت بعض التجارب الحديثة أن بعض الهابتينات المركبة من الممكن أنه تكون أنتيجينات، إذا ما حقنت فى بعض الحيوانات، بينما تكون هابتينات إذا ما حقنت فى البعض الآخر. فقد وجد أن السكريات العديدة للبكتريا تنشط تكوين الأجسام المضادة إذا ما حقنت فى الفئران أو الخيول والإنسان، بينما لا تنشط تكوين مثل هذه الأجسام إذا ما حقنت فى الأرانب.

العوامل التى تحدد الانتيجينية:

غالباً ما يكون الوزن الجزيىء للأنتيجين ١٠,٠٠٠ أو أكثر، وتعتبر بروتينات الدم أنتيجينات مثالية لأن وزنها الجزيئى أكثر من ٦٠,٠٠٠ والمواد ذات الوزن الجزيئى المرتفع مثل الهيموسيانين (٦٧,٠٠٠) وفيروس TMV (١٧,٠٠٠,٠٠٠) تعتبر أنتيجينات مثالية، وكذا البيومين البيض يعتبر أنتيجينا جيداً لأن وزنه الجزيئى ٤٠,٠٠٠، ومع ذلك فقد وجدت أنتيجينات ذات وزن جزيئى منخفض يصل إلى ١٤,٠٠٠ مثل الرايبونيوكليز Ribonaclease و ٥٠٠٠ مثل Phenyliso cyanate.

غالباً ما تكون الأنتيجينات ذات سطح جزيئى كبير، وقد لوحظت أهمية السطح على الأنتيجينية عندما أمكن تحويل بعض المواد غير الأنتيجنية ذات الوزن الجزيئى المنخفض إلى مواد أنتيجينة عند ادمصاصها على سطح مواد أخرى غير أنتيجينة مثل الفحم وأيدروكسيد الألومونيوم والكوارتز، وتجدر الإشارة إلى أن السطح لا يعتبر العامل الأساسى، بل ترجع

أهميته إلى إظهار العوامل المحددة للأنتيجين Determinant Sites الموجودة على سطح الجزيئات.

ولقد ثار جدل الباحثين واهتمامهم لفترة طويلة حول سبب عدم تكوين الكائن الحى (الحيوان) أجسام مضادة لأنتيجينات جسمه، وقد أطلق Finner & Burnet سنة ١٩٤٩ على ذلك اسم التمييز الذاتى Self recognition؛ أى قدرة جهاز تكوين الأجسام المضادة فى جسم الحيوان على تمييز ما هو ينتمى إلى الحيوان نفسه، أو ما هو غريب عنه. ولذلك فإن المادة تكون أنتيجيناً بالنسبة للحيوان التى تعتبر غريبة عنه، ولذلك يجب الإشارة عند التحدث عن الأنتيجينية لمادة ما إلى نوع الحيوان، الذى ثبت أن هذه المادة تعتبر أنتيجينة بالنسبة له، فعلى سبيل المثال فإن البيومين سيرم دم الأرانب يعتبر أنتيجيناً بالنسبة للدجاج ولكن ليس أنتيجيناً بالنسبة للأرانب.

وفى بعض الحالات النادرة والشاذة تعتبر بعض الخلايا أو المواد أنتيجينات بالنسبة للحيوان الذى استخلصت منه، وفى هذه الحالة يطلق على الأجسام المضادة الناشئة عنها اسم Auto Antibodies؛ أى أجسام مضادة ذاتية، كما يطلق على عملية التحصين ذاتها اسم عملية التحصين الذاتى Auto Immunization ، فعلى سبيل المثال.. فإن البروتين المستخلص من عدسة العين من الممكن أن يؤدى إلى تكوين أجسام مضادة إذا ما حقن فى فرد آخر من النوع نفسه، وتحت ظروف خاصة فى الفرد نفسه. وعند حقن خنازير غينيا بالحيونات المنوية لهذه الخنازير يتكون Spermocidin ، وهى عبارة عن أجسام مضادة للحيوانات المنوية Sperm ، ويمكن أن تتحد معها In Vitro ، ويجب أن نشير إلى أن المواد التى تسبب تكوين أجسام مضادة ذاتية Auto Antibodies تكون موجودة أساساً فى أنسجة خاصة، ولا ترتبط بالأنسجة المكونة للأجسام المضادة.

كما أن وجود كرات الدم الحمراء لفرد ما (إنسان مثلاً) من الممكن أن تحتوى على أنتيجينات تسبب تكوين أجسام مضادة، إذا ما حقنت فى فرد آخر أى إنسان آخر، ويطلق على هذه العملية اسم Iso - Immunization .

ولكى تؤدى الأنتيجينات إلى تكوين الأجسام المضادة يجب أن يتم حقنها فى الحيوان، وغالباً يتم هذا الحقن فى الوريد أو الغشاء البروتونى أو الحقن فى العضل، وينتج عن هذا

الحقن تغير فى مصل هذا الحيوان مثل تحول فى جلوبيولين الدم ينتج عنه تكوين أجسام مضادة Antibodies، أو أمينوجلوبيولين Immunoglobulin تكون لها القدرة على الاتحاد مع الأنتيجين Antigen ، والذى يسمى أيضاً أمينوجين Immunogen مكونة راسبًا مرئيًا.

الأجسام المضادة : Antibodies

يعتبر ظهور الأجسام المضادة فى دم الحيوانات أحد ردود الأفعال، التى تتم من جانب الحيوانات ذوات الدم الحار عند دخول جسم غريب له صفة الأنتيجن إلى دمائها.

والجسم المضاد عبارة عن أميونوجلوبيولين، وله القدرة على الاتحاد أو الالتحام مع الأنتيجين الذى سبب ظهوره.

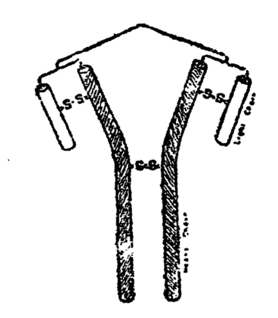
ويتركب جزئ الجسم المضاد (الأميونوجلوبيولين) من سلسلتين بولى ببتيد خفيفتين وسلسلتى بولى ببتيد ثقيلتين، وتلتحمان مع بعضهما برابطة ثنائى الكبريت، وتتكون كل سلسلة من منطقتين إحداهما ثابتة والأخرى متغيرة Variable ، ولكل جزئ منها مكانان للاتصال بالأنتيجين، كما هو الحال بالنسبة للأميونوجلوبين IgG حيث يوجد منها خمس أنواع هى G, M, A, E, D ، والخلايا التى تقوم بإفراز الأجسام المضادة هى خلايا البلازما الموجودة فى الخلايا الليمفاوية (B) ، وتوجد مرحلتان أساسيتان عند تكشف وإفراز الأجسام المضادة. المرحلة الأولى وليس لها علاقة بوجود الأنتيجين، وتبدأ فى المهد، وتظهر باستمرار فى نخاع العظام عند البلوغ؛ حيث يظهر على سطح كل خلية جديدة عند تكونها جزىء الأميونوجلوبيولين بتركيبه الخاص، وكذلك خاصية الالتحام مع الأنتيجين، وكل أبناء هذه الخلايا تحمل نفس الأميونوجلوبيولين، ثم تهاجر تلك الخلايا إلى الأعضاء الأخرى الخاصة بالجهاز المناعى مثل العقد الليمفاوية، حيث تبقى كخلايا ساكنة فى غياب الأنتيجين المناسب، والمرحلة الثانية فى تكشف الخلايا المناعية تحدث عندما يمر الأنتيجين فى الدم حيث يلتحم مع المستقبلات السطحية لجزئ الأمينوجلوبيولين، وهذا يشجع الخلية المناعية على الانفصال والتحول إلى خلايا بلازما التى تفرز فى تيار الدم كميات كبيرة من جزيئات الأميونوجلوبيولين، ذات التخصص نفسه مثل ما هو موجود على الخلية المناعية الأم. وخلال عملية الانفصال تتكون أعداد كبيرة من نقاط التطفر فى DNA الموجود فى المنطقة المتغيرة

من السلسلة البولى ببتيدية، وتخضع هذه الطفرات للانتخاب من قبل الأنتيجين، ومن هنا يتواجد التوافق بين الجسم المضاد ومراكز الالتحام عند الأنتيجين.

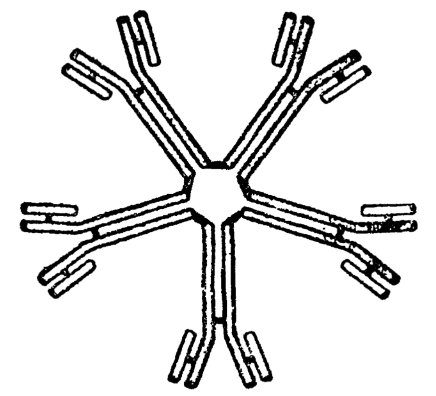
وجزئ الأنتيجين البروتينى يملك عديداً من التراكيب البنائية أو المراكز المحددة للأنتيجينة Antigenic Determinants على سطحه، وتلك يمكن تمييزها بواسطة المستقبلات الموجودة على سطح جزئ الأميونوجلوبيولين (الجسم المضاد) الخاص ببعض الخلايا المناعية الليمفاوية، ولذلك فإن لكل أنتيجين يوجد عديد من الخلايا الليمفاوية التى تختلف فى مناطق الالتحام الموجودة عليها، والتى يمكن تنشيطها عند دخول الأنتيجين، ولذا يكون المصل متعدداً Polyvalent؛ لأنه يحتوى على عديد من الأجسام المضادة المختلفة، التى تتحد مع الأنتيجين، وكل منها ينشأ من خلية مناعية مختلفة.

بعض خواص الأميونوجلوبيولين

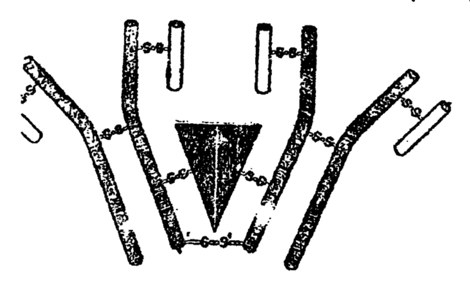
الوظيفة البيولوجية	نصف الحياة يوم	الوزن الجزيئى	mg/100ml	أميونوجلوبيولين
Fix complement cross placenta Hetero cytorophic antibody	١٨ – ٢٢	١٦٠٫٠٠٠	٩٠٠–١٨٠٠	IgG
Secretary Antibody (surface protection)	٥ – ٦٫٥	١٧٠٫٠٠٠ and polymars	١٥٦–٢٩٤	IgA
1- Fix Complement 2- Efficient agglutination	٥	٩٦٠٫٠٠٠	٦٧–١٤٥	IgM
غيرمعروف	٢٫٨	١٨٤٫٠٠٠	٣٫ – ٤٠	IgD
Raginic antibody	٢٫٣	١٨٨٫١٠٥	١٠–١٣٠ ug	IgE



(شكل ٧ - ١) أميونوجلوبيولين IgG



(شكل ٧ - ٢) أميونوجلوبيولين IgM



(شكل ٧ – ٣) أميونوجلوبيولين IgA

طبيعة الأجسام المضادة Nature of Antibodies:

نظراً لأهمية الأجسام المضادة فى المناعة ونظراً لكونها مواد حيوية متخصصة التفاعل، فقد لاقت طبيعتها الكيمائية كثيراً من المحاولات للكشف عنها. وعلى أية حال فحتى الآن **لم يمكن معرفة الأساس التركيبى لهذه المكونات بالطرق الكيميائية؛ لوجود بعض الصعوبات، هى:**

١ – من الصعب الحصول على كميات كبيرة من الأجسام المضادة بصورة نقية.

٢ – عدم تقدم طرق التحليل للبروتينات بما فيه الكفاية.

وعلى كل حال فقد أظهرت بعض الدراسات الخاصة بتغير تركيب الدم بعد عملية حقن الأنتيجين أن الأجسام المضادة تتبع مجموعة الجلوبيولين Globulin من بروتينات المصل. وقد كان التمييز بين الجلوبيولين والألبيومين فى المصل مبنيًّا على درجة الذوبان فى محاليل ملحية متعادلة، ولكن أمكن الفصل بينهما بسرعة الحركة فى مجال كهربائى؛ حيث يتحرك الجلوبيولين ببطء أكثر فى وسط يميل إلى القاعدية. وقد قسمت مكونات الجلوبيولين إلى ثلاثة أقسام تبعاً لحركتها، وأعطيت الأسماء ألفا – بيتا – جاما، مرتبة الأسرع فالأقل، وقد وجد أن الأجسام المضادة جميعها إلا القليل منها تتبع المجموعة الأخيرة أى الجاما جلوبيولين.

والخلايا الليمفاوية لم يمكن زراعتها فى بيئة صناعية In Vitro ، وللتغلب على ذلك قام

كيوهلر وميلستين Kohler & Milstein سنة ١٩٧٥ بانتزاع الخلايا الليمفاوية B-Lymphocytes من فأر بعد حقنه، ثم خلط هذه الخلايا مع خلايا فأر، وعن طريق انتخاب خلايا فردية معينة تم الحصول على خلايا تعطى نوعاً واحداً من الأجسام المضادة، وهى الأجسام المضادة الوحيدة Monoclonal، والتى تكون قد أفرزت من خلية ليمفاوية واحدة.

وقد سبق أن ذكرنا أن الفيروسات النباتية لها صفات أنتيجينة مميزة، ولكن ذلك لا يعنى أنه أمكن تحضير أمصال مضادة لكل الفيروسات النباتية المعروفة، فمازالت هناك بعض الفيروسات مثل فيروس التفاف أوراق البطاطس PLRV لم يفلح الباحثون حتى الآن فى تحضير مصل مضاد له. وقد يعزى الفشل فى تحضير أمصال مضادة لبعض الفيروسات النباتية إلى أسباب متباينة، منها أن يكون تركيز الفيروس ضئيلاً أو إلى عدم ثبات الفيروس حيث يفقد خواصه الأنتيجينة عند استخلاصه، أو إلى احتواء عصير بعض النباتات على نسب عالية من المواد التينينية مثل الشليك، وهذه قد تؤدى إلى تغير فى خواص البروتين الفيروس عند الاستخلاص.

تحضير المصل المضاد للفيروس:

يتم تحضير المصل المضاد لفيروس نباتى ما بالحصول على هذا الفيروس بصورة نقية؛ أى تخليصه من كل الشوائب ذات الصفة الأنتيجينة مثل البروتين النباتى ثم حقن الفيروس النقى فى حيوان التجارب مثل الأرانب أو الفئران، ويتم الحقن فى الوريد أو العضل أو بكليهما معاً أو فى الغشاء البريتونى، أو تحت الجلد، وذلك بجرعات متساوية من الأنتيجين خلال فترة زمنية محددة؛ حيث ثبت أن حقن الحيوان بكميات صغيرة من الأميونوجين (الفيروس) خلال فترة من الوقت يعطى أجساماً مضادة أكثر منها لو حقنت هذه الكمية دفعة واحدة، كما يفضل إجراء الحقن بجرعات متزايدة متعددة للحصول على مصل ذى تركيز عال.

أما فى حالة الفيروسات التى يصعب الحصول عليها بصورة نقية تماماً، فإن الحقن يتم بجرعات صغيرة تتزايد من ٢سم فى المرة الأولى إلى ١٠سم فى الأخيرة، ويتراوح عدد

الحقنات ما بين ٥–١٠ مرات، ويفضل أن يكون الحقن فى العضل بمثل هذه التحضيرات، وعند الحقن فى الوريد يفضل استخدام معلق الفيروس فى محلول ملحى متعادل مع أقل كمية من الفوسفات والبورات، أما عند الحقن فى العضل أو تحت الجلد فعادة ما يخلط التحضير الفيروس قبل الحقن مع مساعد يشجع قدرتها الأنتيجينية، ومن أكثر هذه المساعدات استعمالاً هو مساعد فروند Freund Adjuvant ، ويكون فى صورته غير الكاملة Incomplete عبارة عن برافين معدنى (٨٥٪) Mannide Monolecetos كعامل استحلاب (١٥٪) بينما يضم فى صورته الكاملة Complete حوالى ٠,٠٥٪ وزن / حجم من البكتريا Mycobacterium . ويتكون المستحلب من حجم واحد من المساعد مع حجم واحد من تحضير الفيروس. كما نستعمل مواد أخرى كمساعدات مثل الآجار والجينات الصوديوم، ولكنها لا تضارع مساعد فروند، الذى ظهر أنه يعطى أمصالاً مضادة ذات تركيز أعلى بكثير من الحقن فى الوريد، وعلى الأخص عند استعمال مساعد فروند الكامل.

وبعد أسبوعين إلى أربعة أسابيع من آخر حقنة، يمكن إجراء عملية الفصد للحصول على مصل. فإذا كان الحقن فى الوريد فغالباً ما تجرى عملية الفصد فى الأذن، التى لم تستعمل فى الحقن؛ حيث يتم تنظيف الأذن بالكحول، ويعمل جرح صغير فى العرق الأساسى للأذن بواسطة شفرة حلاقة حادة، ويستقبل الدم فى مخبار زجاجى معقم، ويراعى أنه يجمع الدم على جدار المخبار؛ حتى لا تنفجر كرات الدم الحمراء وبعد جمع كمية الدم المطلوبة يوقف النزيف، وإذا كان المطلوب هو الحصول على دم الأرنب فيمكن ذبحه.

يترك الدم فى المخبار أو الأنبوبة عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين، ثم يفصل عن جدار المخبار برفق بواسطة ساق زجاجية معقمة، ثم يوضع فى الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة ثم يفصل المصل، وتجرى له عملية طرد مركزى بطئ لمدة ١٠ ق على سرعة ٢٠٠٠؛ لإزالة الفيبرين وشوائب الدم. ثم يحفظ المصل بطريقة خاصة حتى لا يتلف، وذلك بوضع المصل فى عبوات صغيرة مع إضافة مادة حافظة مثل الجلسرول أو أوزيد الصوديوم، وتحفظ على حالة سائلة على درجة حرارة ٤°م، كما يمكن حفظها على صورة مجمدة، أو مجففة، وهذه هى

الطريقة الأفضل للمحافظة على فاعلية الأمصال لعدة سنوات.

الأجسام المضادة المونوكلونال : Monoclonal Antibodies

خلال الثمانينيات من هذا القرن زاد الاهتمام بشدة بالأجسام المضادة الـ Mon- (Mabs) oclonal لاستخدامها فى نواحٍ متعددة للبحث فى فيروسات النبات، وعلى وجه الخصوص فى اكتشاف وتشخيص تلك الفيروسات.

إنتاج الأجسام المضادة الـ: Monoclonal

يتم إنتاج تلك الأجسام المضادة حسب الشكل التوضيحى التالى:

١ – حقن الفأر بالأنتيجين الفيروس

٢ – خلايا الميلوما المنزرعة التى

لا تعيش فى بيئة تحتوى على

التيمدين والأمينوبترين (HAT)

خلط خلايا الطحال وخلايا الميلوما ثم

نقل لأطباق تحتوى على ٩٦ نقرة

٣ – فى بيئة HAT تحتوى

خلايا الميلوما، ثم لا يمكن

خلايا الطحال مفردة أن تعيش، وتظل خلايا الهيبوديرما فى المزرعة.

٤ – Hypreourma Cells لاحظ أن خلايا الهيبوديرما تنمو، ثم تختبر المعلق لوجود الأجسام المضادة ذوات التحصن المطلوب.

٥ –

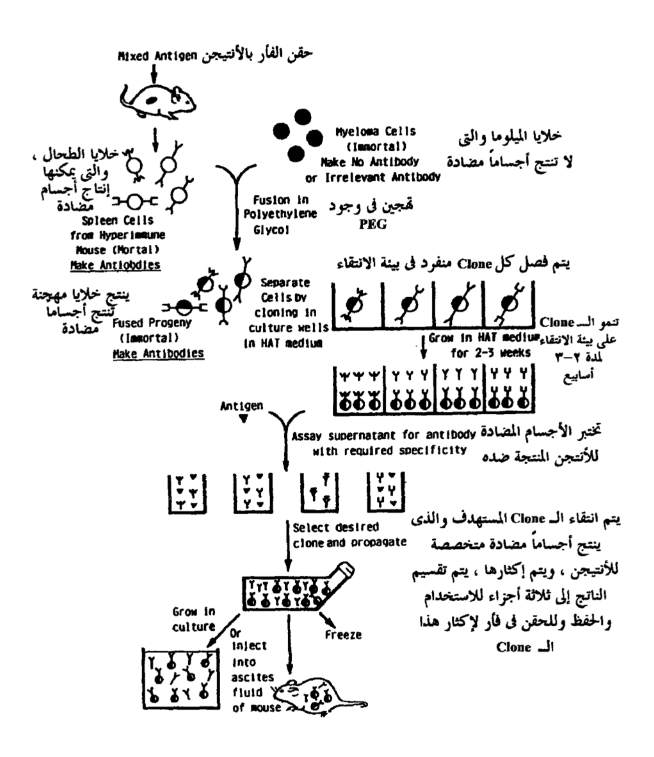
إعادة زرع الهيبوديرما لتأكيد

وجود الزراعات الفردية، ثم تجميد

عينة الخلايا للتأكد من عدم فقد الخلايا.

ثم تحفظ المزرعة، المعلفات تعتبر

عينة للأجسام المضادة ذوات Titre منخفض.

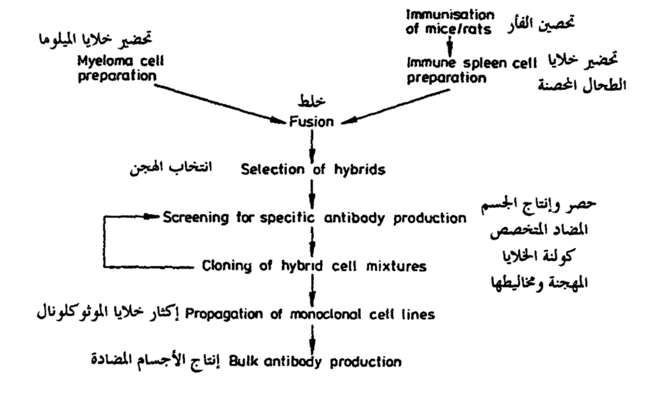


شكل (٧ - ٤) الأجسام المضادة للمونوكلونال

ملاحظة: قدرة انسياب الخلايا لتعيش فى hypoxanthion; aminopterin, Thymi-dine (HAT) المأخوذة من خلايا الطحال؛ حيث تكون القدرة على التضاعف فى بيئة مأخوذة من خلايا الميولوما. نوع اختبار التعرف الذى يستعمل فى الخطوة 111 ليتعرف الأجسام المضادة ذات أهمية خاصة، وبعض المشتغلين يستعملون بعض أشكال من ELISA.

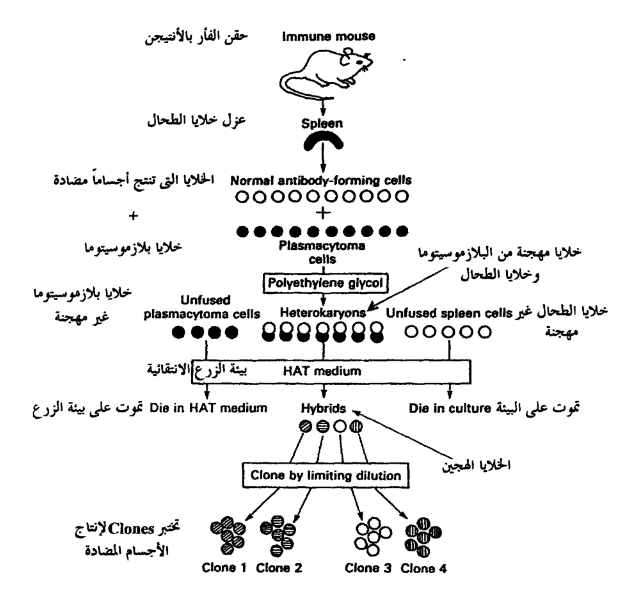
الدليل المعملى للأجسام المضادة المونوكلونال شكل (٧ – ٥)

A Practical Guide To Monoclonal Antibodies

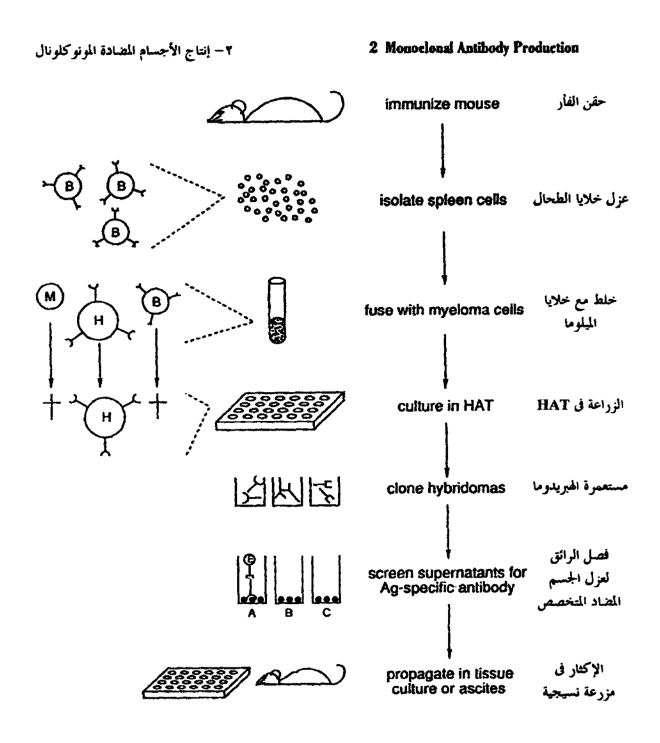


شكل (٧ – ٥)

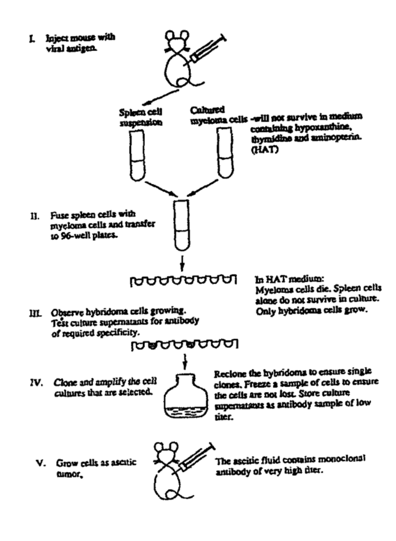
شكل (٧ - ٦): الأجسام المضادة المونوكلونال: أساسيات والتطبيق
Monoclonal Antibodies: Principles and practice



إنتاج الهيبوديرما. اندماج خلايا الطحال لفأر محصن مع HGPRT خلايا نيولوما (بلازما سيتوما) مستعملين بولى إيثيلين جليكولل. اندماج منتجات الباينيوكليت bi-nucleate تعرف باسم heterokaryons، وفى الانقسام التالى تنتشر النواة nuclei خلايا هجن التى تنمو فى بيئة HAT. خلايا الميولوما غير المندمجة (المتداخلة unfused) الميتة فى بيئة HAT وخلايا الطحال غير المندمجة يمكنها أن تعيش لمدة أيام قليلة فى المزرعة. تختبر الهجن لإنتاج الأجسام المضادة ذات الميزات المرغوبة، وتكون بواسطة تخفيف محدود.



شكل (٧ – ٧ أ) الطرق العامة لإنتاج أجسام مضادة مونوكلونال فى الفأر



شكل (٧ – ٧ ب)

إنتاج الهيبوديرما. عندما يستحلب الأنتيجين (imulsified) فى أدجوفنت (adjuvant) مثل أدجوفنت فروند (Freund)، والذى يستعمل بعد ذلك لتحصين فأر أو حيوان آخر. يحصن الفأر باستمرار Frequently بانتيجين. ١ – ٢ أسبوع بعد التحصين الأساسى، وتعزل خلايا الطحال أو العقد الليمفاوية من الحيوان. ٣ – ٤ أيام بعد ذلك.

كما هو مبين فى الرسم، فإن مسئولية الأنتيجين تكون بولى كلونال – خلايا ب B تتحلل؛ بحيث تربط الأنتيجين بواسطة تخصص مختلف قليلاً affinities ، ونشاطات مضادة. (للتبسيط فإن تكوينات شكلها y استعملت فى هذا الرسم لتوضح الأجسام المضادة. كل هذه الأجسام المضادة طبيعة لها سلسلتان ثقيلتان وسلسلتان خفيفتان

ومكانان لارتباط الأنتيجين) يتخلل البولى إيثلين خلايا B فى مخلوط خلايا الطحال بواسطة HGPRT خلايا الميليوما باختلافاتها. تزرع الخلايا بعد ذلك فى بيئة HAT ، وتكون الخلايا قادرة على خلق بيورينات Purines بواسطة طريق Pathway Salvage ، الذى به HGPRT لـ hypoxanthine guanine phosphosibosal transferase إنزيم أساسى.

يحتوى محلول الأورام على الأجسام المضادة الفردية بتركيز عال، وتنمو الخلايا على هيئة أورام.

هذا الشكل يوضح خطوات إنتاج الأجسام المضادة Monoclonal.

ملحوظة:

قدرة الخلايا المخلوطة على البقاء فى بيئات الهيبوزانثين والاميزيترين والثايميدين المستخلصة من خلايا البنكرياس فى حين قدرتها على التكاثر فى نبات مستخلص من خلايا الميلوما myeloma. ويعتبر نوع الاختبار الذى يستخدم فى الخطوة رقم ٣ للكشف عن وجود الأجسام المضادة على جانب كبير من الأهمية. ومعظم الباحثين يستخدمون بعض أشكال اختبار الاليزا ELISA

الاختبارات التى تستخدم فيها الأجسام المضادة: MABs

فى حالة الكشف من الفيروسات أو تشخيص مسببات الأمراض الفيروسية، فقد شاع استخدام الأجسام المضادة MABs بطريقة الـELISA. وللمرة الثانية يمكن القول أن توفير الظروف المناسبة لإجراء الاختبار من حيث الـpH وغيره من العوامل ضرورى جداً لنجاح الاختبار. وفى عدد من التطبيقات، يمكن استخدام بروتوكول طريقة ELISA نفسها، التى استخدمت للكشف عن الأجسام المضادة MABS أثناء عملية الفصل، حيث إنه من الممكن أن تنتخب اجساماً مضادة MABS مختلفة تماماً حسب طريقة ال ELISA التى تستخدم، كما أن قدرة MAB على التفاعل مع أنتيجين معين تختلف كثيراً حسب طريقة اختبار الـELISA المستخدمة.

مزايا الأجسام المضادة : MABs

١ - متطلبات الحقن :

الفيران والأرانب يمكن حقنها بكميات قليلة من الأنتيجين (بين ١٠٠ ميكروجرام أو أقل) ولو كان التحضير الفيروس ملوثًا ببعض مركبات العائل أو غيره من الفيروسات، فإنه يظل من الممكن اختبار الـMABs التى تتفاعل فقط مع الفيروس المطلوب.

٢ -أنها تعتبر طريقة قياسية : Standardization

حيث إن الأجسام المضادة MABs تعطى مركبًا تفاعليًا واحدًا الذى يمكن نشره فى المعامل الأخرى، وبذلك يمكن التخلص من التضارب، الذى كان يحدث فى الماضى عند استخدام الأمصال الـ Polyclonal. وبالإضافة إلى ذلك فإنه يمكن الحصول على كميات غير محدودة من الأجسام المضادة MABs عندما تتوفر الظروف المناسبة.

٣ - التخصص العالى : Specificity

تتحد الأجسام المضادة MABs فقط مع موقع أنتجينى واحد فقط على سطح الأنتيجين، ولذلك فإنها تتمتع بالتخصص العالى، وبذلك يمكن استخدامها كأداة فعالة فى تميز السلالات الفيروسية، كما أنه يمكن استخدام الأجسام المضادة MABs فى دراسة بعض نواحى التركيب البنائى للفيروس، وكذا انتقاله بالحشرات.

٤ - التوافق العالى : High Affinity

إن عملية التصفية للكشف عن الأجسام المضادة MABs تؤدى إلى اختبار الأجسام المضادة التى تتمتع بخاصية الـHigh Affinity التوافق العالى مع الأنتيجين. والأجسام المضادة التى تتمتع بهذه الخاصية يمكن استخدامها بتخفيضات عالية، كما أنه يمكن استخدامها فى تنقية الفيروسات باستخدام طريقة affinity chromotography.

عيوب الأجسام المضادة الفردية : MABs

١ - التحضير : Preparation

تتميز الأمصال العديدة Polyclonal بسهولة تحضيرها. بينما تحتاج طريقة عزل الأجسام

المضادة الفردية MABs إلى جهد كبير ووقت طويل وإلى حد ما مكلفة. ولذلك فإنه عند اقتراح مشروع ما تستخدم فيه الـMABs فلابد من أن يوضع فى الاعتبار تلك العيوب أمام الميزات التى سبق الإشارة إليها.

٢- التخصص: Specificity

الاجسام المضادة الفردية MABs تكون على درجة عالية من التخصص فى بعض التطبيقات خاصة التشخيص، ومع ذلك فإنه يمكن خلطها حتى يمكن أن تعطى تفاعلات على نطاق أوسع.

٣ - الحساسية للتغيرات:

حيث إن الأجسام المضادة MABs على درجة عالية من التخصص، فإنها تكون حساسة جدا لأى تغيرات فى الأنتيجين الذى يمكن أن تحدث نتيجة للتجفيف والتحول الى الحالة الصلبة أو أى ظروف أخرى تحدث أثناء الاختبار. ومع ذلك فلا زالت الأجسام المضادة الفردية MABs تعتبر من أفضل الوسائل لدراسة كثير من النواحى فى الفيروسات النباتية، ولكنها لا يمكن أن تحل كلية محل الأمصال Polyclonal.

الفصل الثانى

طرق تشخيص الفيروسات النباتية سيرولوجياً

Serological diagnosis of Plant Viruses

إن أساس الطرق السيرولوجية المستخدم فى الكشف عن الفيروسات النباتية هو اتحاد أنتيجن الفيرس مع الأجسام المضادة له وتكوين راسبا مرئيا.

ويمكن إجراء التفاعل بين الأنتيجين الفيروس والأجسام المضادة له antibodies بطرق مختلفة، وبالنسبة للفيروسات النباتية يمكن استخدام الطرق التالية لإجراء هذا التفاعل:

١ - اختبار التجمع Aggluination test

٢ - اختبارات الترسيب Precipitation test

٣ - اختبار الانتشار فى الآجار Agar gel diffusion test

٤ - اختبار ربط العامل المذيب Complement fixatation

٥ - اختبار إبطال العدوى Nutralization of infection

٦ - اختبار الحساسية Anaphylaxis

٧ - اختبار المصل المرتبط بالأنزيم Enzyme - linked Immuno - Sorbent assay (ELISA)

٨ - اختبار Dot - Blot

٩ - اختبار Westetrn Blotting

١٠ - الميكروسكوب الإليكترونى للتحليل السيرولوجىSSEM

١- اختبار التجمع : Agglutination test

وقد كان هذا الاختبار فى الماضى شائعًا لسهولة إجرائه ولإمكانية رؤية التفاعل مباشرة

وإمكانية استخدامه فى الحقل . ومن أبسط الطرق التى استخدمت منذ الثلاثينيات هى طريقة النقطة Drop test method عن العالمان دونين وبابوفا Dounin & Papova حيث توضع نقطة من عصير النبات المصاب بالفيرس على شريحة زجاجية، ثم تخلط مع نقطة من المصل المضاد للفيرس، ويقلب المخلوط فينتج عن ذلك راسب مرئى، يمكن ملاحظته بالعين المجردة فى خلال ثوان قليلة، ويساعد على رؤية الراسب تجمع الكلوروبلاستيدات عند اتحاد الفيرس مع الأجسام المضادة، ومن هنا اطلق على الاختبار اسم اختبار التجمع، وعموماً يطلق هذا الاسم؛ حينما يكون الأنتيجين الداخل فى التفاعل خلية كاملة مثل البكتريا، وحيث يطلق على اتحاد الفيرس النباتى النقى مع الأجسام المضادة له يطلق عليه اسم راسب، بينما يطلق على الاختبار باسم اختبار الترسيب.

وقد ظهرت مواد أخرى مثل خلايا الدم الحمراء للغنم أو جزئيات اللاتكس، التى تدمص عليها جزئيات الفيرس، أو الأجسام المضادة لإجراء اختبار التجمع.

٢ - اختبارات الترسيب : Precipitation tests

الغالبية العظمى من الأنتيجينات عليها العديد من مناطق الالتحام، وهذا يعنى أن كل جزئ أو جسيمة فيرسية من الممكن أن تتحد مع العديد من جزئيات الأجسام المضادة، وحيث إنه يعتقد أن الأجسام المضادة ثنائية الأوجة أى يحتوى كل منهما على منطقتين، أو على وجهين للالتحام مع الأنتيجين المتجانس معه فإنه عند خلط التحضير الفيرس مع المصل المضاد له، يتم الالتقاء بين طرفى التفاعل ويتم الالتحام بينهما؛ أى إنه كل جسيم فيروسى تتحد مع عديد من الأجسام المضادة، وهذه بدورها تلتحم من مكان الالتحام الثانى بأنتيجين آخر، وبذلك يتكون راسب يكبر باستمرار حتى يمكن روئيته.

ويمكن إجراء اختبار الترسيب للكشف عن الفيروسات النباتية بعدة طرق، نذكر منها اختبار الترسيب فى أنابيب Tube precipitation test ، وهى أكثر الاختبارات وأبسطها استعمالاً، وفى هذا الاختبار يتم خلط كميات صغيرة متساوية من الأنتيجين والمصل المضاد فى أنابيب صغيرة فى ظروف مناسبة، ثم يراقب تكون الراسب.

وهناك عدة عوامل تؤثر على دقة هذا الاختبار، وأهمها:

تركيز كل من الأنتيجين والأجسام المضادة؛ حيث من الممكن أن يمتنع ظهور الراسب نتيجة لزيادة تركيز الأنتيجين عن حد معين، وكذا نتيجة لزيادة الأجسام المضادة فى المصل المستخدم؛ ولذا فمن الضرورى عمل المخلوط من تخفيفات مختلفة لكل منهما؛ حتى يمكن التأكد أن عدم ظهور الراسب لايرجع الى زيادة أحد العنصرين.

وبالنسبة للفيروسات والامصال فإنه يوجد تخفيف لا يمكن للفيرس أو للمصل أن يعطى تفاعلاً عنده، ويطلق عليه بالنسبة للفيرس نقطة التخفيف النهائية Dilution end point ، وبالنسبة للمصل Titre ، كما أن وجود الأملاح ورقم الأس الأيدروجينى من العوامل التى تؤثر على دقة اختبار الترسيب؛ حيث ظهر من بعض التجارب، التى أجريت على فيروسات عصوية أن التغير فى رقم الأس الأيدروجينى pH يؤثر أو يغير من درجة تجمع الجزئيات الفيرسية، الأمر الذى يؤثر بالتالى على سرعة الترسيب، وكذا على التخفيف المناسب لإجراء التفاعل؛ فعلى سبيل المثال وجد أن فيرس TMV عند تخفيف ١/١٢٨ يعطى راسبًا مرئيًا عند خلطه بالمصل المضاد، إذا كان رقم الـpH ٧ .

كما أن وجود الأملاح مهم للغاية لاختبار الترسيب؛ حيث وجد أن وجود الأملاح ضرورى لظهور الراسب، ولذا يجرى تخفيف المواد الداخلة فى التفاعل بمحلول ملحى فسيولوجى، كما أن الحرارة عامل من العوامل المهمة التى تؤثر على اختبار الترسيب؛ ولذا فإن الأنابيب التى تحتوى على الأنتيجين والمصل المضاد بعد خلطهاجيدا توضع رأسيًا فى حمام مائى ذى درجة حرارة، يمكن التحكم فيها بواسطة ثرموستات، وتتوقف درجة الحرارة المستخدمة على مدى ثبات الفيرس. بالنسبة للفيروسات النباتية يمكن استخدام درجة حرارة ٥٠م، أما بالنسبة للفيروسات الأقل ثباتًا فتستخدم درجة حرارة أقل من ذلك ٣٧م، كما يراعى عند وضع الأنابيب فى الحمام المائى أن يكون نصف محتواها مغموراً فى الماء، إذ إن ذلك يسرع من الترسيب، كما أنه يسهل من مشاهدة الراسب فى المراحل الأولى لتكونه.

وقد ذكر باودن وبيرى Bawden & Pirie أن الفيروسات كروية الشكل، تعطى راسبًا متماسكًا وحبيبيًا بينما الفيروسات ذات الشكل العصوى تعطى راسبًا هشًا ومتجمعًا،

ويمكن للفيروسات العصوية أن تعطى النتيجة نفسها (راسب حبيبى متماسك) إذا ما تم تقصير أو تكسير تلك العصويات، ويجرى ذلك بإجراء عملية تجميد وإسالة لعدة مرات متتالية؛ مما يرفع من كفاءة التفاعل ونجاحه فى حالة الفيروسات العصوية او الخيطية.

ويستخدم اختبار الترسيب فى الأنابيب، بالإضافة إلى تشخيص الفيروسات النباتية فى معايرة كل من الفيرس والمصل المضاد، فعند معايرة الفيرس يوضع $\frac{١}{٢}$ نصف مم من الفيرس فى سلسلة تخفيفات متضاعفة، ويخلط كل تخفيف من الفيرس مع $\frac{١}{٢}$ نصف مم من المصل المضاد ذى تركيز ثابت، والعكس يتم عند معايرة المصل المضاد؛ حيث يتم تخفيف المصل، بينما يظل تخفيف الفيرس ثابتًا. وللحصول على أفضل صورة لاختبار الترسيب، تعمل مخاليط لكل من الأنتيجين مع كل تخفيف من المصل المضاد، ثم يسجل الوقت اللازم لظهور الراسب فى كل مخلوط، ويمكن التعبير عن هذه النتائج بخطوط كونتور بيانيا، يتضح منها المخاليط التى تظهر رواسبها فى الوقت نفسه، كما يتضح منها أيضًا أن نسبة الخلط المثلى لكل تركيز مصل مضاد تكون مختلفة عن تلك الخاصة بالفيرس.

كما يستخدم اختبار الترسيب على نطاق واسع لتقدير تركيز أنتيجين الفيرس فى التحضيرات المختلفة أو فى العوائل المختلفة وذلك بمعرفة نقط التخفيف النهائية لكل منها، كما سبق أن شرحت فى اختبار المعايرة.

كما يستخدم اختبار الترسيب فى تعريف الفيرس وتقدير درجة القرابة السيرولوجية لفيروسين أو بين السلالات المختلفة لفيرس ما، حيث تحمل الأنتيجينات الفيروسية أعدادًا من المواقع المحددة Determinat site فإذا كانت العزلتان عبارة عن فيروسين مختلفين أى إنه لا يوجد بينهما أى اشتراك أو تشابه فى المواقع المحددة، فإن المصل المضاد لأحدهما لا يعطى أى تفاعل مع الآخر. أما إذا كانت العزلتان لهما المواقع المحددة نفسها، فإن المصل المضاد لإحداهما يعطى مع الأخرى. أما إذا كانتا تشتركان فى عدد من المجموعات المحددة دون الأخرى، فإن التفاعل يتم بينهما بهذا القدر نفسه من الاشتراك.

وفى سنة ١٩٦٥ قام فان سلوجترن van slogtern بإجراء اختبار أسماه اختبار الترسيب

الدقيق Micropreciptin test ، وهو صورة مصغرة لاختبار الترسيب فى أنابيب؛ حيث يستخدم أطباق بترى صغيرة، تغلف بمادة الفورمفار أو السليكون Formvar or Silicon أو تستخدم أطباق معدة خصيصًا ذات شبكة من الثقوب غير العميقة، وتوضع نقطة واحدة من كل من المواد المتفاعلة (أنتيجين – أجسام مضادة)، ثم تعطى النقط بسائل البرافين لوقف عملية البخر، وتحضين هذه الأطباق، التى تحتوى على نقط بنسب مختلفة بين الأنتيجين إلى المصل المضاد، ثم يختبر الراسب باستعمال الميكروسكوب، وتعتبر هذه الطريقة أكثر حساسية من اختبار الترسيب فى أنابيب، كما أنها تستخدم كميات صغيرة جداً من المواد المتفاعلة.

ومن اختبارات الترسيب أيضًا اختبار الحلقة : Ring interface test

وهو اختبار بسيط حيث يتلاقى الأنتيجين مع الجسم المضاد بواسطة الانتشار، ولإجراء هذا الاختبار يوضع قليل من المصل المضاد فى أنبوبة زجاجية ضيقة أو أنبوبة شعرية، وتوضع طبقة من تحضير الفيرس بعناية على القمة. تنتشر جزئيات الفيرس والأجسام المضادة، ويتكون الراسب حينما يتلاقيان بنسب مناسبة، ويتم ذلك خلال دقائق.

٣ – اختبارات الانتشار فى الآجار : Gel - diffusion test

وهذا الاختبار يشبه اختبار الحلقة، ويختلف عنه فى أن الطبقة السفلى تكون فى آجار جل مخفف، وتحتوى عادة على الأنتيجين، وهذا يطلق عليها الانتشار الفردى Single diffusion ، وقد وضعه Oudin سنة ١٩٤٦ . وفى هذه الحالة تتكون طبقة من الراسب فى الجل (بدلاً من السائل) عندما تتلاقى كميات مناسبة من الأنتيجين والأجسام المضادة . وحدث تعديل لهذا الاختبار، وذلك بوضع المصل المضاد فى ثقب من الآجار فى طبق بترى، ثم تعمل ثقوب فى الآجار حوله، وملأها بتحضيرات الأنتيجين، وفى هذه الحالة تتكون هالة من الراسب حول الثقب الأوسط، ويطلق على هذا الاختبار اسم الانتشار الإشعاعى Redial diffusion test ، وأكثر اختبارات الجيل شيوعًا فى الاستعمال هو اختبار (أوخترلونى)، والذى يطلق عليه two dimensional double diffusion test ، ويجرى هذا الاختبار

بصب الآجار الساخن أو محلول أجاروز على شريحة زجاجية أو طبق بترى ويترك ليبرد؛ ليكون طبقة من الجيل، ثم تعمل ثقوب بعد ذلك فى الجيل وتملأ بالمواد المتفاعلة (الأنتيجن والأجسام المضادة) وفى هذه الحالة عندما توضع الأمصال المضادة المختلفة المناسبة، وتحضير الفيرس فى ثقوب متجاورة، تتكون طبقة الراسب عند الزاوية الصحيحة لأقصر خط يصل ما بين الثقبين.

ومن أهم مميزات طريقة الانتشار فى الآجار ما يلى:

١ - يمكن فصل مخاليط الأنتيجينات بواسطة الأجسام المضادة لكل منها، وذلك بناء على معدل انتشار كل منها فى الآجار، أو على أساس معدل هجرة كل منها فى وسط كهربى Immuno electropheresis ، أو بناء على هاتين الخاصتين مجتمعتين.

٢ - إجراء مقارنة مباشرة بين نوعين مختلفين من الأنتيجينات، وذلك بوضعهما فى ثقبين متجاورين على الطبق نفسه، ومن المعتاد ان يوضع المصل فى الثقب الاول بينما توضع الأنتيجينات فى ثقوب تحيط بثقب الوسط، وتنتشر الأنتيجينات والأجسام المضادة باتجاه بعضهما خلال الآجار جل، وبعد مضى بعض الوقت تتكون منطقة يلتقى بها شقًّا التفاعل بنسب مناسبة لتكوين راسب، وينضم إلى المنطقة المزيد من الأنتيجين والأجسام المضادة مما ينتج عنه بناء خط ترسيب واضح يمكن رؤيته، إلا أن هذه الطريقة لا تستخدم إلا مع الفيروسات التى تنتشر خلال الآجار.

٤ - اختبار ربط العامل المذيب لكرات الدم الحمراء: Complement fixation test

لم ينتشر هذا الاختبار فى الكشف عن الفيروسات النباتية حاليًا لصعوبة إجرائه من ناحية، ولوجود بعض المواد فى عصير بعض النباتات تعوق إجراء التفاعل من ناحية أخرى.

وفى هذا الاختبار يكشف عن حدوث التفاعل أو الاتحاد بين الفيرس والأجسام المضادة بطريقة الأدلة Indicator method؛ أى بطريقة غير مباشرة لعدم ظهور راسب يمكن رؤيته.

وأساس هذا الاختبار أن المصل الطازج يحتوى على عدة مواد غير متخصصة، يطلق عليها مجتمعة اسم Complement ، ويمكن لهذه المواد أن تتدخل فى اتحاد الأنتيجين مع الأجسام المضادة، فلو حدث هذا التفاعل بين الأنتيجين والأجسام المضادة فى وجود هذه

المواد فإنها ترتبط؛ أى لا تصبح حرة فى المصل، ولكى يمكن التعرف عما إذا كانت هذه المواد ارتبطت أم لا، ويجرى اختبار يطلق عليه اسم الاختبار الدال Indication reaction، الذى يعتمد على وجود الـComplement ، بصورة حرة فإذا ما حقن الأرنب بكرات الدم الحمراء المأخوذة من الغنم فإنه يمكن الحصول على أجسام مضادة لها، ويحتوى هذا المصل على Complement، والذى إذا ما خلط مع كرات الدم الحمراء للغنم يسبب إذابتها ولذا يعتبر هذا الاختبار دليلا على وجود الـComplement حرًا أو مرتبطا ومن الممكن إزالة هذا الـComplement من المصل عن طريق تسخينه عند درجة حرارة ٥٦م لمدة نصف ساعة. ولذا فإن إجراء اختبار ربط العامل المذيب لكرات الدم الحمراء يتم على مرحلتين: ففى المرحلة الاولى يخلط الأنتيجين مع المصل المضاد له بدرجات تخفيف مختلفة، فى وجود العامل المذيب Complement لكرات الدم الحمراء، وتحتفظ هذه المخاليط لمدة ساعة عند درجة حرارة ٣٧م حتى يتم ربط العامل المذيب تمامًا.

وفى المرحلة الثانية: يتم الاختبار الدال على ربط العامل المذيب، حيث يضاف إلى الأنابيب كريات دم حمراء مأخوذة من الغنم بعد غسلها، وكذا مصل أرنب بعد تسخينه، ثم يحفظ المخلوط عند درجة حرارة ٣٧م، ثم تراقب درجة ذوبان كريات الدم الحمراء على فترات مختلفة.

فإذا كان العامل المذيب Complement ارتبط تمامًا فلا يحدث إذابة لكريات الدم الحمراء، وهذا معناه أنه قد حدث تفاعل بين الأنتيجين والأجسام المضادة، أما إذا ذابت كريات الدم الحمراء وانتشر اللون الأحمر فى أنبوبة الاختبار، فيدل ذلك على أن العامل المذيب لكرات الدم الحمراء لم يرتبط وما زال حرا، وبالتالى يدل على عدم حدوث تفاعل بين الأنتيجين والأجسام المضادة.

٥ - اختبار المصل المرتبط بالإنزيم

Enzyme - linked Immuno - Sorbent Assay (ELISA)

وتعتبر هذه الطريقة الآن من أحدث وأدق الطرق السيرولوجية التى تكشف عن الفيروسات فى العينات المحتوية على أقل كمية من الفيروسات، ويمكن أيضًا استخدامها فى التقدير الكمى، وترجع هذه الطريقة إلى الجهود التى قام بها Clark & Adams سنة ١٩٧٧

للكشف الدقيق والتقدير الكمى للفيروسات النباتية سيرولوجيا.

وتعتمد هذه الطريقة على القياس اللونى الناتج من تفاعل الإنزيم المرتبط بالمصل المضاد المتخصص للفيرس، وعند تفاعله مع الفيرس الخاص به يعطى اللون الاصفر، وهذا اللون يرى بالعين المجردة، وكذا يمكن قياسه بجهاز القياس الضوئى على موجة طولها ٤٥ نانوميتر.

وفى هذه الطريقة يجهز المصل المضاد للفيرس فى صورة جاما جلوبيولين نقى، وكذا يرتبط جزء من المصل النقى بإنزيم **Alkaline Phos phatase** ، والذى يتفاعل بعد ذلك مع مادته المتخصصة **p - Nitrophengl phosphate** ، ويجرى هذا التفاعل فى الـ **microtiter-plate** ، وهى تحتوى على ٩٦ أو ١٠٠ نقرة سطحها من مادة البولى سترين، وتستعمل لمرة واحدة فقط.

ولقد ظهر فى السنوات الأخيرة عديد من التعديلات والتطوير فى الطريقة الأساسية بهدف جعل الاختبار مناسبًا لأغراض معينة، وهذه الطريقة مفيدة جدًا، حينما يكون مطلوبا إجراء عدد كبير من الاختبارات إذ إنها على درجة عالية من الحساسية حيث يمكنها الكشف عن التركيزات القليلة والتى تقل عن ١ إلى ١٠ ميكروجرام، كما أن هذه الطريقة اقتصادية فى استخدام الأمصال.

وهناك الآن طريقتان أساسيتين لإجراء الاليزا، هما:

الطريقة المباشرة Direct وقد شاع استخدام الطريقة المباشرة إلا أنه يحدد استخدامها عاملان أساسيان أولهما أنها تكون شديدة التخصص للسلالة، وهذا يعتبر مفيداً للتمييز بين سلالات الفيرس الواحد، ولكنها تقلل من قيمتها عند إجراء التشخيص الروتينى، إذ يمكن لبعض السلالات ألا تظهر فى الاختبار، والعامل الثانى هو احتياجها إلى تحضير مركبات مختلفة من الإنزيم المرتبط والأجسام المضادة لكل فيرس يراد اختباره.

والطريقة غير المباشرة أى طريقة ساندويتش الأجسام المضادة المزدوج فإن الإنزيم المستخدم فى الخطوة الأخيرة للكشف يكون مرتبطًا بأجسام مضادة، لأنتجلوبيولين الدجاج المضاد للأرانب يمكن استخدامه لربط الإنزيم، وعلى هذا الأساس فإن تحضيراً واحداً

للأنتجلوبيولين يمكن استخدامه فى عدد كبير من الفيروسات، التى حضرت أجسامها المضادة فى الأرانب وبالإضافة إلى ذلك.. فإن الطريقة غير المباشرة يمكنها الكشف عن عدد كبير من الفيروسات المتقاربة باستخدام مصل واحد.

كما ظهر فى السنوات الأخيرة اختبار الاليزا المكرر Repeat - ELISA وتعتبر هذه الطريقة أحدث تطوير لطريقة الاليزا حيث إنه بعد قراءة اللون للمرة الأولى، تحضن الأطباق لمدة ساعة، فى وجود محلول الإزالة لإزالة الجسم المضاد الأول، والثانى المرتبط بالإنزيم دون إزالة الأنتيجين من آبار أطباق الاليزا، ثم الغسيل حوالى عشر مرات بالماء المقطر، ثم بالـ TTBS، وإعادة وضع التخفيفات نفسها من المصل المضاد للفيرس أو السيرم العادى ثم تكرار مراحل الإزالة السابقة نفسها.

٦ - طريقة : Immnno Dot Blot

وفى هذه الطريقة تستخدم أغشية النيتروسيليولوز كبيئة صلبة لإجراء الاختبار. فى بعض الحالات فإن الفيرس الموجود فى العصير النباتى يتم حجزه على الغشاء كخطوة أولى ولإظهار اللون النهائى، يضاف الإنزيم المرتبط بالأجسام المضادة Ig G ، الذى يتحول إلى مادة غير ذائبة ملونة، ويمكن قياس كثافة اللون إما بالعين أو بجهاز قياس الكثافة الانعكاسى Reflectance densitometer.

ومن أهم مميزات هذه الطريقة Dot Blot: السرعة والتكلفة البسيطة وقلة كميات المواد المستخدمة فى التفاعل، وهذا التفاعل يناسب الاختبارات المعملية؛ حيث تكون بساطة الاختبار وقلة التكلفة مطلوبة.

٧ - طريقة Western Blotting :

وتعتمد هذه الطريقة على استخدام قدرة الاليكتروفوريس على فصل وتحليل البروتين فى الآجار فى الوقت نفسه، مع كفاءة فى تعريف وتقدير البروتين الفيرسى. والمراحل الأساسية للطريقة تنحصر فى فصل البروتين الفيرسى باستخدام دوديسيل الصوديوم سلفات وبولى اكريلاميد جيل اليكتروفوريس SDS - PAGE، ثم النقل الكهربى للبروتين من الجيل إلى

أغشية النيتروسيليولوز، ثم قص أغشية النيتروسلولوز المحتوية على بروتين الفيرس، ثم بحقن الشرائط بعد ذلك مع المصل المضاد للفيرس، ثم الغسيل ثم التحضين فى وجود الجسم المضاد الثانى المرتبط بإنزيم الفوسفاتيز، ثم الغسيل والتحضين فى وجود المظهر لإظهار اللون.

ومن أهم خصائص هذه الطريقة: أنه يمكن عن طريقها تعريف الفيرس عن طريق خاصيتين مستقلتين من خصائص الكابسيد البروتينى، هما: الوزن الجزيئى، والتخصص السيرولوجى.

٨ - الميكروسكوب الإليكترونى المتخصص للتحليل السيرولوجى: SSEM

ذكر ماثيوز (١٩٩٤) أن هذه الطريقة تعتمد فى التشخيص على خاصيتين من خصائص الفيرس، هما: قدرة الفيرس على التفاعل مع المصل المضاد الخاص به، وكذا الشكل المورفولوجى لجزئيات الفيرس.

وفى هذه الطريقة تُغطى الغشاء المغلف لشباك العينات الخاصة بالميكروسكوب الإليكترونى بالمصل المضاد الخاص بالفيرس المراد اختباره، ثم توضع الشبكات طافية فوق المعلق الفيرسى، وفى هذه الأثناء تلتصق أعداد كبيرة من جزئيات الفيرس، ويمكن مشاهدتها بالميكروسكوب الإلكترونى بطريقة الصبغ السالب.

وفى تعديل للطريقة السابقة، فإنه بعد التصاق الجسيمات الفيرسية على شبكة العينة تتم تغطيتها بالمصل المضاد المتخصص للفيرس، وهذا يؤدى الى إحاطة جسيمات الفيرس بهالة من جزئيات الاميونوجلوبيولين، والتى يمكن رؤيتها باستخدام طريقة الصبغ السالب بالميكروسكوب الإليكترونى للاندماج المتخصص بين فيروس ما والأمينوجلوبيولين.

ومن أهم مميزات هذه الطريقة أن النتائج تكون واضحة؛ فيتم التشخيص بالجسيمات الفيروسية ذات الشكل المورفولوجى المحدد، ولهذا فإنه من النادر أن تعطى هذه الطريقة نتائج إيجابية كاذبة. كما أن دقة هذه الطريقة تقارب طريقة ELISA، ومن الممكن أن تكون دقتها أكثر لألف مرة من استخدام الميكروسكوب الإليكترونى العادى.

كما أن تغطية الأغشية المبطنة للشبكة بالأجسام المضادة تقلل جداً من الجسيمات التى تنتمى للعائل النباتى من أن تعلق بها. كما أن هذه الطريقة تسمح باستخدام الأمصال كما هى وحتى الأمصال ذات التركيز المنخفض، كما أنها لاتستهلك كمية كبيرة من هذه الأمصال أو الأنتيجين.

كما أن هذه الطريقة تسمح بنقل الشباك المعدة إلى معامل أخرى لمعاملتها بالمستخلص الفيرس، ثم إعادتها مرة أخرى لاستكمال بقية خطوات الفحص.

إلا أنه توجد بعض العيوب التى تعترض طريق شيوع استخدام هذه الطريقة، ومنها أنها لا تمكن من فحص بعض الجزيئات التى تقل فى حجمها كثيراً عن أن تظهر فى الميكروسكوب الإليكترونى، مثل: الوحدات البنائية للكابسيد البروتينى. كما أن هذه الطريقة مكلفة، وذلك لارتفاع سعر الميكروسكوب الإليكترونى وأدواته والمواد المستخدمة، كما أن الميكروسكوب يحتاج إلى خبرة وكفاءة خاصة فى تشغيله، مما يجعل هذه الطريقة لا يمكن أن تنافس طريقة الاليزا ELISA فى الاستخدام على نطاق واسع، ولكن مع ذلك يظل الميكروسكوب الإليكترونى ذا قيمة كبرى فى تعريف الفيروسات المجهولة، وفى حالة الحاجة إلى عدد قليل من الاختبارات التشخيصية.

الباب الثامن

طرق انتقال فيروسات النبات

Methods of Plant Viruses Transmission

طرق انتقال فيروسات النبات

METHODS OF PLANT VIRUSES TRANSMISSION

تختلف طرق ووسائل انتشار الفيروسات اختلافًا كبيرًا، فغشاء الخلايا السليلوزى فى النباتات المزهرة جعلها لا تصلح لأن تكون وسطا يتردد عليه الفيروس ويدخل بداخلها. ولكى ينتقل الفيروس إلى العائل، يجب أن يصل إلى داخل خلايا هذا العائل لكى يتكاثر بداخلها. وبعض الفيروسات لا يتكاثر إلا فى خلايا معينة من العائل، وفى هذه الحالة يجب أن تدخل تلك الفيروسات فى هذه الخلايا حتى يمكنها أن تتكاثر. وإصابة الفيروس للنباتات المزهرة دائمًا ما تظهر على أنها إصابة عن طريق الجروح wounds، فعن طريق تلف فى جدار الخلية يدخل الفيروس إلى البروتوبلازم الحى للخلية ويتكاثر فيه.

وربما يمكن نقل الفيروسات النباتية من النباتات المصابة إلى النباتات غير المصابة بعدة طرق، مثل: التطعيم والطرق الميكانيكية والحشرات وغيرها، فالطرق الثلاث السابقة قد نجحت مع بعض الفيروسات، ولكن واحدة أو اثنتين منها نجحت فقط مع البعض الآخر. فمثلاً فيروس Y البطاطس Potato virus Y وموازيك الخيار CMV ربما يمكن نقلها بالطرق الثلاث السابقة. وفيروس X البطاطس (PXV) والتقزم الشجيرى فى الطماطم Tomato bushy stunt يمكن نقلهما بنجاح بواسطة كل من طريقة التطعيم والعدوى الميكانيكية، ولكنه حتى الآن فإن هذه الفيروسات لم يمكن نقلها بالحشرات. كما أن مرض التفاف أوراق البطاطس Potato leaf roll وبعض الفيروسات الأخرى أمكن نقلها بالتطعيم والحشرات ولم يمكن نقلها بالطرق الميكانيكية. وموزيك التفاح Apple mosaic وتقزم الخوخ Peach rossette وغيرها لم ينجح نقلها حتى الآن إلا بطريقة التطعيم.

ومن المعتقد أن الفيروسات التى تمكن نقلها بالتطعيم فقط حتى الآن، لها حشرات ناقلة لم تكتشف بعد، فمثلاً مرض *Abutilon variegation* معروف من أكثر من ٧٠ سنة أنه ينتقل بالتطعيم، ولم تكتشف الحشرات الناقلة له *Bemisia tabaci* إلا حديثًا بواسطة

Orlando & Silberschmidt سنة ١٩٤٦ . وبعض الفيروسات يمكن نقلها بإحداث العدوى لبعض العوائل وليست كل العوائل. وهذا يؤدى إلى سؤال لماذا تفشل بعض حالات العدوى الميكانيكية، وهل هذا الفشل نتيجة لخواص الفيروس، أو بسبب صفة موروثة فى العائل النباتى الذى يوجد به الفيروس.

وعلى العموم يمكن تلخيص الطرق التى تنتقل بها فيروسات النبات فى الآتى:

١ – الانتقال الميكانيكى: Mechanical transmission

٢ – الانتقال عن طريق التكاثر الخضرى والتطعيم: Transmission by vegatative propagation and grafting

٣ – الانتقال بواسطة الحامول: Transmdssion by dodder

٤ – الانتقال عن طريق البذور: Seed transmission

٥ – الانتقال عن طريق التربة: Soil transmission

٦ – الانتقال بواسطة الحشرات: Transmission by insects

٧ – الانتقال بواسطة الحلم والعناكب: Transmission by mites

٨ – الانتقال بواسطة حبوب اللقاح: Pollen transmission of plant viruses

أولاً: الانتقال الميكانيكى: Mechanical transmission

وينتقل بهذه الطرق الميكانيكية عصير النبات الحامل للفيرس إلى خلايا العائل السليم، عن طريق إحداث جروح wounds فى تلك الخلايا. وتعتبرطرق النقل الميكانيكى أكثر إفادة فى التجارب، وذات قيمة متوسطة فى الطبيعة. وتعزى معظم معلوماتنا الأساسية فى أمراض النبات الفيروسية إلى طرق النقل الميكانيكى، وتوضيح ظاهرة العدوى Infectivity كما ذكرها ماير Mayer (١٨٨٦)، والقدرة على المرور خلال الراشحات Filterability كما ذكرها ايفانوفسكى Iwanowski (١٨٩٢)، وفترة الكمون المؤقت Lateney كما ذكرها جونسون Johnson (١٩٢٥)، وتقدير الفيرس بواسطة تقدير العدوى الموضعية Local

lesion assay كما ذكره هولمز Holmes (١٩٢٩) والمناعة المكتسبة Acquired immuni-ty كما ذكرها ونجارد Wingard (١٩٢٨) وقابلية بلورات الفيروس على إحداث العدوى كما وجدها ستانلى Stanley (١٩٣٥)، وظاهرة الطفرات Mutability كما ذكرها جينسين Jensen (١٩٣٦)، وقدرة الحمض النووى Nucleic acid للفيروس على إحداث العدوى كما وجدها جيرر، تشيرام (١٩٥٦) Gierer & Schramm وقدرة إعادة بناء الفيروس re-constitution كما ذكرها فرانكل كونرات، سنجر (١٩٥٩) Fraenkel-Conrat & Sing-er، وكذلك قدرة تكاثر البكتريوفاج Bacteriophage فى النبات كما ذكرها ساندر Sander (١٩٦٤)، وكل هذه المعلومات جميعها تعتمد على طرق النقل الميكانيكى.

طريقة هولمز، أى طريقة تكون النقط الموضعية على عوائل معينة عند اصابتها بالفيروس، علاوة على أنها تساعد على الكشف عن وجود الفيروس وقياس مدى قدرته على الإصابة infectivity ، وقياس كفاءة اللقاح، ومدى إصابة العائل، فقد امتد استخدامها إلى فيروسات أخرى، وإلى عوائل أخرى وقدمت عدة تحسينات، والإصابة الموضعية Local le-sions ربما تكون صورة اصفرار Chlorotic، أو موت الخلايا وربما تنمو هذه البقع (النقط) أو تبقى دون زيادة فى الحجم بعد تكوينها، وقد تتكون أو لا تتكون إصابة جهازية منها، فيما بعد . وربما تتكون نقط موضعية فى مكان الوخز بالناقلات . ويرى البعض أنه يمكن اتخاذها كدليل على معدل انتقال الفيروس بواسطة الناقلات المختلفة .

وربما يمكن ملاحظة النقط الموضعية بالعين المجردة فى وقت قصير مثل ١٨ ساعة فى حالة فيروس موزايك الخيار CMV على أوراق اللوبيا، وفيروس TNV على اللوبيا و TMV على الفاصوليا تحت الظروف المناسبة؛ حيث إن نباتات الفاصوليا واللوبيا تتمكن من إنتاج ورقتين فلقيتين ويمكن إحداث العدوى عليها بعد ١٠ أيام من الزراعة، وهى عوائل ممتازة فى تقدير النقط الموضعية، واستخدام هذين العائلين يمكن اكتشاف وجود كميات قليلة من الفيروس عما لو استخدمت الحشرات أو الميكروسكوب الإلكترونى، أو باستخدام امتصاص الأشعة فوق البنفسجية U.V. absorption، أو أى طريقة معروفة أخرى .

وربما يعطى الفيروس نفسه على العائل نفسه أعراض نقط موضعية تحت ظروف بيئية

معينة وأعراض جهازية في ظروف أخرى. أو ربما ينتج أعراض نقط موضعية، ثم تتحول إلى إصابة جهازية. وربما تسبب سلالة فيروس معينة أعراض نقط موضعية في عائل، بينما لا تسبب سلالة أخرى تلك الأعراض. وعلى الرغم من ذلك فالإصابة الفيروسية التي تعطي أعراضًا ذات نقط موضعية لا تتحول عمومًا إلى اصابة جهازية، والإصابة الجهازية لا تبدأ كنقط موضعية عادة.

وتغطي الأوراق والأجزاء النباتية الأخرى والتي يدخل الفيروس خلالها بالكيوتيكل Cuticle، ويوجد أسفل الكيوتيكل جدار خلوي صلب Rigid cell wall وغير معروف إلى أي حد يجب كسر كل من الكيوتيكل وجدار الخلية. ويرى بعض العلماء أن الفيروس يجب أن يدخل مباشرة إلى الفجوة الخلوية Vacuole، على الرغم من معدل النقل المنخفض للفيروس (حوالي ١٠٪)، عندما يدخل كمية كبيرة من جزئيات (جسيمات) الفيروس في فجوة الخلية مكان الإصابة Site of infection، ولو أن الجروح تعتبر ضرورية للعدوى إلا أنها تلتئم بسرعة، وأن اللقاح inoculum الذي يوضع بعد إحداث الجروح يكون دائمًا أقل عما لو استخدم اللقاح والجرح معًا عند إحداث العدوى. وربما يبقى مكان الإصابة قابلاً للإصابة لفترة من الزمن تحت ظروف معينة.

وتنقسم هذه الطرق إلى طرق نقل صناعية inoculation وطرق نقل طبيعية:

أ - طرق طبيعية:

فمثلاً فيروس موزايك الدخان TMV ينتقل ببساطة من النباتات المصابة إلى النباتات السليمة؛ نتيجة لتلف ناتج عن اجراء بعض العمليات الزراعية المختلفة كالعزيق والشتل ومرور العمال بين النباتات في المزرعة. وفي أثناء القيام بمثل هذه العمليات يقع العصير من الخلايا المجروحة للنباتات المصابة على أيدي أو ملابس العمال أو الأدوات، التي يستعملونها، والتي إذا ما لامست نباتات أخرى سليمة، سببت لها جروحًا ونقلت لها العدوى.

وينتقل طبيعيًا نتيجة جرح النباتات نتيجة الاحتكاك كثير من الفيروسات، مثل: فيروس موزايك الدخان TMV موزايك الخيار CMV وفيروس X البطاطس PVX وبعض الفيروسات الأخرى.

ب - طرق نقل العدوى صناعيًا:

وفى هذه الطرق تعمل جروح صناعية دقيقة فى خلايا العائل وخاصة الأوراق، حتى يمكن لعصير النبات المصاب والحامل للفيرس الدخول لتلك الخلايا وإحداث العدوى، ويجب أن تكون الجروح دقيقة جداً حتى لا تموت الخلايا المجروحة؛ مما يؤدى إلى عدم حدوث العدوى، وتستخدم عدة مواد لإحداث تلك الجروح مثل الرمل الناعم جداً والفحم ومسحوق الصنفرة Carborandum وكذلك بللورات الـ Celite. وترش هذه المواد المستخدمة لإحداث الجروح، وتسمى abrasives على سطح الورقة، وعادة ما يلى ذلك حقن النبات بواسطة دهن سطح الورقة بلطف بقطعة من القطن أو الشاش مبللة بعصير نبات مصاب أو باستخدام Q-tips وغيرها.

وحيث إن عديداً من الفيروسات النباتية يمكن إحداث العدوى بها صناعيًا بنقل عصير نبات مصاب إلى جروح فى نبات سليم وقابل للإصابة، فالسؤال الذى يمكن أن يكون فى الاعتبار هو: لماذا لم يمكن نقل جميع الفيروسات؟ **وتوجد ثلاثة أسباب قد تفسر ذلك، وهى:**

١ - قد تكون خاصية بعض الفيروسات والتى تمنع النقل الميكانيكى، حيث قد لا يقدر على تحمل التغير الحادث عن طحن وتكسير خلايا عائلها.

٢ - كما أن فشل النقل الميكانيكى ربما يكون نتيجة لوجود تركيز منخفض (واطئ) من الفيروس أى أدنى من أقل تركيز لازم لإحداث الإصابة؛ حيث من المعروف أن بعض الفيروسات والتى لها أكثر من عائل نباتى، يكون تركيز الفيروس عاليًا فى بعض النباتات عن غيرها. فمثلاً فيروس Dandelion yellows mosaic virus لا يمكن نقله من نبات Dandelion مصاب إلى نبات الداندليون Dandelion سليم، ولكن يمكن نقله من الداندليون إلى الخس ثم من الخس إلى الداندليون، ويمكن نقله من الخس المصاب إلى السليم.

وقد وجد Kassanis عام ١٩٤٧ أن الخس يحتوى على تركيز عالٍ من هذا الفيروس عما يحتويه الداندليون.

٣ - خاصية العائل النباتى نفسه، والتى ربما تمنع الإصابة، ويمكن للعائل النباتى أن يؤثر على إحداث العدوى، حيث إن عصيره ربما يحتوى على مواد، إما أن تمنع الإصابة Inhibit infection أو تثبط الفيروس Inactivate the virus فمثلاً فيروس موزيك الخيار CMV يمكن أن يصيب عديد من النبات يحتوى على مواد، يبدو أن لها تأثيراً على الفيروس وإحداث الإصابة، وقد ذكر سيل وزملاؤه Sill et al عام ١٩٥٢ أن العصير الخلوى لأوراق وسيقان نبات الخيار يحتوى على مواد يبدو أنها مثبطة لفيرس موزايك الخيار، ويبدو أن هذه المواد المثبطة إما غائبة تماماً أو موجودة بتركيزات منخفضة جداً فى عصير تويج أزهار الخيار Flower corolla. وقد وجد أن حقن أوراق اللوبيا بالعصير المأخوذ من بتلات أزهار الخيار المصابة يعطى عدداً من النقط الموضعية Iocal lesions زيادة كبيرة عن نظيرتها المتكونة عند أخذ العصيرمن أجزاء نبات الخيار المصابة الأخرى. والفيروسات التى تصيب نباتات الفصيلة الوردية Rosaceous plants عادة لايمكن نقلها ميكانيكيًا، أو تنقل بصعوبة بالغة، وذلك عند استخدام الحقن بالعصير إلى نبات الورد السليم. وعلى الرغم من ذلك فإن استخدام الحقن بالعصير Sap inoc-ulation كان ناجحًا فى حالات الأنواع النباتية الأخرى. فمثلاً فيروس التبقع الحلقى فى الكريز Sour cherry ringspot virus، يمكن نقله إلى بادرات الخيار. ولم يعرف السبب فى صعوبة نقل الفيروس من نباتات الفصيلة الوردية بطريقة الحقن للعصير.

وفى حالة الشليك.. فإن الأوراق تحتوى على كمية كافية من التانين tannin تكفى لتثبيط فيروس موزيك الدخان TMV، وتدل على أن فشل النقل بالحقن بالعصير يعزى إلى خاصية العائل، وليس إلى الفيرس.

وفى حالة موزايك البطاطا Sweet potato mosaic فإن الحقن بالعصير يكون ناجحًا فقط، عندما تستخدم عصير من جذور ثمرية Fleshy root وليست من أوراق أو سيقان النبات المصاب. ويبدو أن العصير المأخوذ من صحن ودهك أوراق أو سيقان البطاطا يحتوى على مادة تثبط فيروس موزايك البطاطا.

ولم يعرف تماما الاحتياطات اللازمة لحدوث الإصابة الفيروسية بطريقة الحقن بالعصير

Sap inoculation فيلزم إحداث جروح للخلايا فى منطقة الحقن بالعصير، ويلاحظ – كما سبق القول – أن تلك الجروح لاتسبب موت الخلايا؛ حيث إن موت الخلايا يمنع إحداث الإصابة لأن الفيروس طفيل اجبارى obligate parasite، ولا يمكنه التكاثر بالبقاء إلا فى الخلايا الحية.

وهناك عوامل كثيرة تؤثر على نسبة نجاح العدوى الصناعية، منها:

١ – وجد أن تعريض النباتات للظلام لمدة ٢٤–٤٨ ساعة، قبل التلقيح يزيد من نسبة العدوى.

٢ – رش الأوراق قبل التلقيح مباشرة يقلل من نسبة العدوى.

٣ – غسيل الأوراق بالماء بعد التلقيح مباشرة وجعل الأوراق رطبة مدة طويلة يزيد نسبة العدوى.

٤ – وجد أن بعض الفيروسات تزداد نسبة العدوى بها فى حالة وضع النباتات قبل التلقيح على درجة حرارة مرتفعة نسبياً.

٥ – المواد المثبطة Inhibitor بالعصير المستخلص من بعض النباتات تكون حاملة لمواد مثبطة للفيروسات، ومقاومتها بمواد معينة تساعد على زيادة النقل الميكانيكى.

٦ – المواد الخادشة: Abrasives – أثبتت التجارب أن استعمال مواد خادشة مثل الرمل الناعم والفحم، celite والكاربورندم (٤٠٠–٦٠٠) mesh فى عملية التلقيح الميكانيكى قد زاد من كفاءة العملية زيادة كبيرة، قد تصل إلى حوالى ١٥٠ ضعفاً.

٧ – إضافة محلول منظم فوسفاتى لعصير النبات، أو إضافة المحلول المنظم بعد التلقيح مباشرة يزيد نسبة العدوى لبعض الفيرسات.

٨ – تختلف نسبة تركيز الفيروس فى الأجزاء المختلفة التى بها تركيز عالٍ من الفيرس.

٩ – وعمر الفيروس فى العائل الذى يستخدم كمصدر للعدوى، له دخل كبير فى نسبة تركيز الفيرس، حيث نجد أن تركيز الفيرس يزداد فى العائل المصاب لعدة أيام أو أسابيع، ثم ينخفض.

١٠ – قابلية العائل للإصابة.

١١ – قابلية الخلايا للإصابة. وقد وجدت أدلة بأن الخلايا تختلف فى قابليتها للإصابة بالفيرسات، وأن الظروف الملائمة للإصابة لفيروس ما ليس من الضرورى أن تلائم غيره. وقد ذكر بودن أن نبات الدخان البرى *N. glutionsa* عندما يكون له ٨–١٠ أوراق، وإذا لقحت نصف الأوراق المتقابلة بالتتابع بفيروس موزايك الدخان TMV وفيروس التقزم الشجيرى فى الطماطم Tomato bushy stunt virus، فإن فيروس TMV سينتج نقطًا محلية (موضعية) Local lesions على كل الأوراق، ولو أن معظمها سينتج على الأوراق الوسطى والسفلى. وبالعكس من ذلك فإن فيروس TBSV سوف لا يكون نقطًا محلية على الأوراق السفلى، وعدداً قليلاً على الأوراق الوسطى، ويكون معظمها على الأوراق العليا. وحيث إن الضرر Injuries الناتج من التلقيح متشابه فى كل منهما، فيبدو أن الجروح نفسها ليست من الضرورى أن تؤكد الإصابة، ولكن الخلايا التى حدث بها الضرر يلزم أن تكون فى حالة استقبال recep-tive state، وأن هذه الحالة تختلف مع الفيروسات المختلفة.

١٢ – عمر النبات: حيث إن قابلية النبات للإصابة تتأثر بعمره. فمثلاً نبات الفاصوليا وعمرها حوالى ١٠ أيام تحدث بها العدوى عند تلقيحها من Tobacco necrosis أى نيكروزيس الدخان وبعض الفيروسات الأخرى، ولكن بعد ٣–٤ أيام بعد ذلك لا تحدث أية عدوى إطلاقًا.

ثانيًا: الانتقال عن طريق التكاثر الخضرى والتطعيم:

Transmission by Vegetative propagation and grafting

التكاثر الخضرى هو إكثار النباتات باستعمال أجزاء النبات ما عدا البذور، ولذا فإن التكاثر الخضرى يشمل: التركيب Grafting، والتطعيم Buddings والعقل Cutting والترقيد Layering والمدادات Ranners والدرنات Tubers والكورمات Cormes والأبصال والريزومات Rhisomes والفسائل offshoots والسرطانات suckers.

إن النباتات التى تكون فيها الفيروسات مهمة اقتصاديًا، هى التى تتمكن الفيروسات من إحداث إصابة جهازية بها Systemically وذلك كنتيجة لإصابة نقطة واحدة فقط، هى مكان إحداث العدوى، ثم تنتشر بعد ذلك إلى معظم أو كل الأجزاء الخضرية فى النبات. وحيث إن النباتات ليس لها القدرة على تكوين مواد مضادة Antibody-forming mecha-nism عند إصابتها بالفيروسات، كالذى يوجد فى الحيوانات، ولذلك فالنباتات التى تصاب جهازيًا بالفيروسات عادة تعطى مصدراً مستمراً للفيرس، طالما مازال الجزء الخضرى النباتى حيًا.

ويجب أن نتذكر أنه ليست كل النباتات متساوية فى قدرتها فى إيجاد ظروف ملائمة لبقاء الفيروسات، فالعائل النباتى الذى يصاب بفيروس ما، ويعطى إصابة محلية فقط local-ly، أو تموت الخلايا المصابة بسرعة بعد العدوى، فإنها تعطى للفيروس فترة قصيرة لتكاثره. بالمقارنة مع النباتات التى تصاب جهازيًا Systemically وتتكاثر خضريا، فإنها تشكل مصدراً دائمًا للفيروس سنة بعد أخرى لتكاثره داخل هذا العائل نفسه، وحتى دون أية تعرض لنقل الفيروس من عائل آخر. وعادة مثل هذه النباتات المعمرة أو التى تتكاثر خضريًا تكون – فى الواقع – المصدر الرئيسى للفيروسات إلى النباتات الحولية. ويجب أن نبين مدى أهمية النباتات المعمرة، والتى تتكاثر خضريًا ليس فقط فى حفظ وتكاثر الفيروسات Per-petuating viruses، ولكن أيضًا فى مساعدتها على الانتشار، فأى طريقة تستخدم فيها: درنات –أبصال– كورمات – مدادات – سرطانات – أو عقل جذرية... الخ، فإن احتمال إنتاج خلفة منها حاملة للفيروس يكون عاليًا جداً، إذا كان النبات الأب يحتوى على فيروس.

ومن الفيروسات التى تنتقل عند تكاثر النباتات المصابة خضريًامثل فيروسات البطاطس مثل فيروس x البطاطس، وفيروس مرض تجعدأوراق البطاطس. وتختزن الفيروسات التى تصيب نباتات العائلة الزنبقية فى الأبصال كفيروس موزايك البصل، كما يعيش الفيروس أيضًا فى الثمار الجذرية مثل فيرس موزايك واصفرار البنجر، ويشذ عن ذلك مرض اصفرار الأستر الذى يصيب البطاطس، ولكنه لاينتقل عن طريق الدرنات.

وانتقال الفيروس أيضًا بتطعيم النباتات السليمة بأجزاء من نباتات تحمل الفيروس،

وتعتبر طريقة التطعيم الطريقة الوحيدة فى نقل الفيروسات، التى ثبت نجاحها عمليًا مع جميع الفيروسات. وفى عملية التطعيم grafting يلزم وجود توافق compatability بين الأصل والطعم. وعندما يحدث اتحاد والتحام بين الأصل والطعم، فإن نجاح انتقال الفيروسات يتوقف على قدرة الفيروس على الحركة خلال الأنسجة الخضرية.

وعادة يعطى الانتقال بالتطعيم نتائج مختلفة عن طرق النقل الميكانيكية، أو بواسطة الحشرات ويمكن تفسير ذلك بسببين، **والسبب الأول** والأكثر قبولاً، هو أن النباتات التى ينقل المرض منها بالتطعيم تكون مصابة بأكثر من فيروس واحد، وكلها تنقل بطريقة التطعيم، بينما قد لا تنقل كلها بالطريقة الأخرى. **والسبب الثانى** أن النقل بالتطعيم غالبًا ما يؤدى إلى إصابة جهازية systemic فى العائل، الذى يعطى فقط عرضًا كنقط (محلية) Local lesions عندما يلقح بالطرق الميكانيكية. فعندما يطعم نبات الدخان البرى *N.glutionsa* مع طعم مأخوذ من نبات الدخان العادى أو الطماطم المصابة بفيروس موزايك الدخان، يحدث لنبات الدخان البرى الموت، مع ظهور مرض جهازى مسببًا موت القمة وتحللها، بينما فى حالة العدوى بالطرق الميكانيكية يحدث فقط تكوين أعراض النقط الميتة، بالقرب من مكان إحداث العدوى بالعصير المحتوى على الفيروس. ويحدث مثل هذا التأثير فقط عندما يطعم عائل حساس hypersensitive host مع عائل آخر يتحمل tolerant للفيروس.

ولو أن انتقال الفيروسات باستخدام طريقة التطعيم من الطرق التى تأخذ وقتًا ومجهودًا كبيرًا، إلا أنها من الطرق التى تستخدم خاصة مع الفيروسات، التى لا يعرف طريقة أخرى لنقلها.

ثالثًا : الانتقال بواسطة الحامول : Transmission by dodder

يمكن للفيروسات أن تنتقل من نبات مصاب إلى سليم بالمرور، خلال أنسجة النباتات المتطفلة التى توصلها ببعضها. وقد استخدم فى ذلك الحامول *Cuscuta spp* لنقل كثير من الأمراض وخصوصًا للأمراض، التى لم تعرف بعد طرق انتقالها، ولا يمكن استخدام طرق التطعيم لعدم توافق نوع النبات المصاب ونوع النبات السليم، الذى يراد نقل الفيروس إليه.

واستخدام الحامول كطريقة تطعيم غير مباشرة مفيد فى كثير من الأبحاث الفيروسية.

ولقد استعمل الحامول Dodder لهذا الغرض وتتلخص الطريقة فى تغذية النبات المتطفل أولاً على نباتات مصابة، ثم السماح بعد ذلك لأفرع الحامول بأن تلتصق بالنباتات السليمة. ولقد وجد Bennett عام ١٩٤١ أن حامول *Cuscuta california* ينقل فيروس موزايك الخيار CMV، وأن حامول *C.subinclusa* ينقل فيرس تجعد قمة بنجر السكر SBCTV. وأنه لمن المعروف أيضاً أن الحامول *C.campestris* ينقل مختلف فيروسات الحسليات stone fruit viruses، حيث إن هذا الحامول مثلاً له القدرة على التطفل على أكثر من ١٠٠ نوع نباتى مختلف.

هناك حالات تفضل فيها الحشرات الناقلة للفيروس التغذية على الحامول، بدلاً من النبات العائل. ومن الأمثلة الدالة على ذلك تغذية حشرات النطاطات *Circulifer tenellus* الناقلة لفيروس تجعد قمة بنجر السكر Sugar-beet curly top virus على الحامول المتطفل على نبات الدخان البرى *N.glutinosa* المصاب بمرض تجعد القمة، كما ذكر العالم Giddi-ngs (١٩٤٧) أن الحامول يستعمل أيضاً فى فصل الفيروسات المختلفة فى نبات واحد عن بعضها البعض، كما هو الحال فى مرض White clover mosaic، الذى يتسبب عن فيروسين: أحدهما Pea mottle virus الذى يمكن نقله بواسطة الحامول *Cuscuta cam-pestris*، والآخر Pea wilt virus الذى لا ينقل بواسطة الحامول كما ذكر العالم Johnson (١٩٤٢).

وقد ذكرت قائمة تضم أكثر من ٥٠٠ نوع نباتى، تنتمى إلى ٧٨ عائلة نباتية كعوائل لأكثر من عشرة عوائل من الحامول، وبعض الفيروسات المعروف بأنها تنتقل بواسطة نوع واحد أو أكثر من انواع الحامول، هى:

١ – التقزم الأصفر فى الشعير Barley yellow dwarf.

٢ – تجعد القمة فى البنجر Beet curly top.

٣ – اصفرار البنجر Beet yellows.

٤ – تشقق قلف الموالح (فيرويد) Citrus excortis virorid.

٥ – قوباء الموالح Citrus psorosis.

٦ – التدهور السريع فى الموالح Citrus tristeza.

٧ – موزايك الخيار Cucumber mosaic.

٨ – موزايك الحامول الكامن Dodder Latent mosaic.

٩ – تبرقش البسلة Pea mottle.

١٠ – تورد الخوخ Peach rosette.

١١ – الذبول المبقع فى الطماطم Tomato spotted wilt.

١٢ – موزايك الدخان Tobacco mosaic.

١٣ – خشخشة الدخان Tobacco rattle.

وكذلك الميكوبلازما، مثل:

١٤ – مكنسة الساحرة فى البرسيم الحجازى Alfalfa Witches, broom.

١٥ – اصفرار الأستر Aster yellows.

والفيروسات الثلاثة التالية وجد أنها تتكاثر داخل نباتات الحامول التى تقوم بنقلها:

١ – اصفرار الباى بيرى Bay berry yellows.

٢ – أزهار الكرانبيرى الكاذبة Cranberry false blossom.

٣ – موزايك الخيار Cucumber mosaic.

٤ – موزايك الحامول الكامن Dodder Latent mosaic.

هذا وقد ذكر العالمان Kunkel (١٩٤٥) ;Raychauahur (١٩٥٣) أن الفيروس الأول والثانى لم يمكن نقلهما بالعصير، ولكن يمكن نقلهما عن طريق الحامول إلى عديد من العوائل النباتية.

وللحامول كفاءة عالية فى نقل الفيروسات التى تصيب نبات الحامول نفسه. ولكنه أيضًا يمكنهم من نقل فيروسات أخرى مثال فيروس موزايك الدخان TMV، الذى لا يتكاثر فى داخل نبات الحامول، ويعتقد أن الحامول يعمل كقنطرة توصيل Conducting channel.

ولا يوجد شك فى أن استخدام الحامول كطريقة لكشف عوائل جديدة للفيروسات التى كان يعتقد أن المدى العائلى لها محدود، وسوف يسهل دراسة مثل هذه الفيروسات وكذلك يسهل عمل مقارنة بينها، والفيروسات الأخرى، الشىء الذى كان يعتبر مستحيلاً. ولو أنه يجب الحرص فى ذلك حيث قد توجد بعض الأخطار فى استخدام مثل هذه الطريقة فى التجارب، فحين نمد أو نجد عائلاً جديداً لبعض الفيروسات، فربما نمد أيضًا الفيروس بطريقة جديدة لانتشار، وربما يكون العائل الجديد عائلاً للحشرة التى قد تعمل كناقلة للفيروس.

رابعًا: الانتقال عن طريق البذور: Seed Transmission

أولاً: البذور وأهميتها (Seed borne Viruses):

تعرف البذرة فى النباتات البذرية بأنها البويضة المخصبة الناضجة بعد نمو الزيجوت بها، وتكشفه إلى الجنين الذى يمثل الطور الجرثومى الصغير للنبات، محاطًا بأغلفته فى حالة تلون غالبًا. وتعتبر البذرة أداة حفظ النوع فى النباتات البذرية السائد، كذلك عامل مهم فى المحافظة على استمرار تطور الأنواع النباتية، بما تشمله من أنواع العمليات الجنسية والوراثية، التى تدخل فى إنتاجها. ويعتبر استخدام التقاوى الخالية من الأمراض المختلفة ضرورياً جداً لتحسين إنتاج المحاصيل الزراعية المختلفة سواء بستانية أو حقلية، وذلك مهما توفرت عوامل الإنتاج الأخرى من مواعيد زراعة ورى وتسميد وغيرها.. فلن يعوض الضرر الناتج عن استخدام تقاوى مصابة بالأمراض والنتيجة هى خفض المحصول الناتج كمًا ونوعًا.

ثانيًا: الأهمية الاقتصادية لانتقال الفيروسات عن طريق البذور:

أعطى انتقال الفيروسات عن طريق البذور أهمية اقتصادية قليلة لعدة سنوات مضت، وذلك لعدم الأهمية الاقتصادية للمحاصيل التى تنتقل الفيروسات عن طريقها، ولكن الآن عرف حوالى ٨٥ فيروسًا و ١٢٠ عائلاً، أكثرها نباتات اقتصادية تشترك فى الانتقال بالبذرة،

وكذلك اتضحت أهمية الانتقال بالبذرة نتيجة:

١ - بعض الفيروسات التى تنتقل بالبذرة، تعتمد كليًا أو جزئيًا على الانتقال لمسافات طويلة وكثير من هذه الفيروسات قادر على إلحاق ضرر شديد للمحاصيل النباتية التى تصيبها، بالإضافة إلى قدرة بعض هذه الفيروسات فى الاحتفاظ بحيويتها مدة طويلة بالبذرة، وبالتالى نجد أن **البذرة تلعب دوراً مهمًا فى انتشار وحفظ الفيروس. ومثال ذلك:**

أ - أهمية الانتقال عن طريق البذور فى حمل فيروس موزايك الفاصوليا العادى Common bean mosaic Virus (CBMV) أثناء انتقال كميات البذور التجارية، حيث يعتبر انتقال هذا الفيروس فى البذور عاملاً مهمًا فى إنتاج الفاصوليا فى الأماكن، التى تنمو فيها أصناف الفاصوليا الحساسة للمرض الفيروسى، ومن المحتمل أن الانتقال عن طريق البذور هو العامل الرئيسى فى التوزيع الجغرافى الواسع لفيروس موزايك الفاصوليا العادى.

ب - انتقال فيروس التخطيط الموزايكى فى الشعير Barley stripe mosaic خلال بذور الشعير والقمح مسئول عن الخسارة الكبيرة فى هذين المحصولين فى عدد من مناطق إنتاج الحبوب فى العالم.

٢ - انتقال الفيروس عن طريق البذور يؤدى لإصابة النبات فى أطوار نموها الأولى مما يجعلها كمصادر عدوى مبكرة فى الحقل، والأهمية القاطعة للنقل عن طريق البذرة أنه حتى فى حالة الانتقال بنسبة منخفضة التى قد تصل إلى ٠,٥٪ أو أقل، وفى حالة زراعتها فى وجود حشرات نشيطة فى موسم النمو، يمكن أن تحدث خسائر كاملة للمحصول، **مثال ذلك:**

أ - كان Doolitle & Gilbert (١٩١٩) أول من بينا الأهمية الاقتصادية لانتقال الفيروسات عن طريق البذور، عندما وجدا أن نسبة من بذور الخيار البرى *Echinocistis lobata* المصابة بفيروس موزايك الخيار تحمل الفيروس وتنشأ مركز لإصابة حقول الخيار المنزرعة تجاريًا، عن طريق البذور الحاملة للفيروس عن طريق الناقلات الطبيعية.

ب- مثال نباتات الخس المصابة بفيروس موزايك الخس Lettuce mosaic virus (LMV) تصل نسبة الانتقال لأكثر من ٥٪ خلال بذور الخس، ولكن الانتقال عن طريق البذور يعتبر العامل الرئيسى فى نشر الفيروس فى إنجلترا؛ حيث يعتبر النقل عن طريق بذور الخس عاملاً من العوامل المحددة لإنتاج الخس، فإذا ارتفعت نسبة البذور المصابة عن ٠,١٪ فإن مقاومة المرض فى الحقل تكون غير مرضية؛ لذلك فإن استعمال تقاوى خالية تماماً من الإصابة الفيروسية طريقة أساسية لمقاومة الفيروس فى ولايتى كاليفورنيا وأريزونا بالولايات المتحدة الأمريكية، مثل: الصنف Cheshunt Early Giant الذى لا ينتقل الفيروس خلال بذوره.

٣ - ومع أن انتقال الفيروس عن طريق بذور بعض النباتات ليس ذا أهمية اقتصادية كبيرة بالنسبة للنبات الناقل نفسه، إلا أن النقل عن طريق هذا الصنف من النبات قد يكون بالغ الأهمية بالنسبة للمحاصيل الأخرى، التى يصيبها الفيروس، ويزداد انتشاره عن طريق هذه البذور المصابة.

مثال: فيروس موزايك قصب السكر Sugar Cane mosaic virus (SCMV) ينتشر بسرعة أكثر بين حقول الذرة والأنواع الأخرى الحساسة عن طريق المن، ومن المحتمل أن النسبة الصغيرة من الانتقال عن طريق بذور الذرة تمكن الفيروس من الانتشار فى مناطق بعيدة عن مناطق انتشاره.

٤ - انتقال الفيروس عن طريق البذور أضاف صعوبة إنتاج أصول من الشتلات خالية من الفيروس فى الفواكه الحجرية، كما فى حالة فيروس النيكروز الحلقى فى الكريز Cherry necrotic ring spot virus الذى ينتقل عن طريق البذور؛ مما يسبب انتشاره الكبير فى أصناف عديدة خاصة الأصناف، التى يصعب فيها مشاهدة أعراض واضحة. ولمقاومة المرض، لابد من عمل اختبارات مستمرة للشتلات التى يفضل زراعتها قبل استعمالها. كذلك بالنسبة للموالح.. فإنه من المعروف عدم مقدرة أغلب الفيروسات التى تصيب الموالح على النقل عن طريق البذور، وهذا له أهميته الكبيرة فى إنتاج مزارع خالية من الأمراض.

٥ - من ناحية أخرى أشار العالم Cadman سنة ١٩٦٣ إلى أهمية نقل الفيروسات عن طريق

البذور فى الدور، الذى تلعبه فى نقل الفيروسات التى تنتقل بالنيماتودا. ولقد أثبت Lister and Murant سنة ١٩٦٧ أن النيماتودا يمكنها أن تحمل فيروس الحلقة السوداء فى الطماطم Tomato blackring virus، وتصبح معدية عن طريق تغذيتها على البادرات المصابة بالفيروس عن طريق البذرة. ولقد أثبت الباحثان أن النيماتودا يمكنها أن تحمل الفيروس حوالى ٩ أسابيع، ولكن عندما تنمو بذور الحشائش الحاملة للمرض، فإن النيماتودا تستعيد قدرتها على حمل الفيروس وإصابة النبات عن طريق التغذية على هذه الحشائش - كما أثبت الباحثان أن فيروس الحلقة السوداء فى الطماطم (TBRV) يرجع انتشاره إلى النقل عن طريق البذرة، أكثر منه عن طريق النيماتودا الناقلة للفيروس؛ وذلك لأن النقل عن طريق النيماتودا يحدث فى مناطق محدودة وانتشاره منها يكون بطيئًا بعكس البذور، التى يمكن أن تنقل الفيروس لمسافات كبيرة جداً، كما وجد الفيروس منتشراً فى الأماكن، التى لا توجد فيها النيماتودا الناقلة للفيروس.

وكذلك ينتقل فيروس Tobacco ratlle virus عن طريق بذور *Stellaria media*، وعن طريق النيماتودا. *Trichodorus pachydermus& T. primitivus*.

وعن طريق هذه العلاقة يزداد تأثير الانتقال بالبذرة وبالنيماتودا، حيث **أظهرت الفيروسات التى تنتقل عن طريق النيماتودا قدرة عالية على الانتقال خلال البذور، وذلك للأسباب الآتية:**

أ - وجود مدى عوائلى واسع من الأنواع النباتية التى تنتقل الفيروسات عن طريق بذورها، فقد وجد أن Tobacco ringspot virus ينتقل خلال بذور عديد من العوائل، مثل: فول الصويا والدخان والبتونيا، وكذلك عن طريق النيماتودا *Xiphinema americanum*.

ب - لارتفاع نسبة البذور المصابة المأخوذة من نباتات حاملة للفيروس.

٦ - من الأهمية الاقتصادية لانتقال الفيروس عن طريق البذور أن القائمين بالحجر الزراعى فى أغلب الأحوال لا يستطيعون بسهولة تحديد هذه الفيروسات فى البذور، الأمر الذى يساعد على دخول هذه الفيروسات إلى البلاد الخالية منها.

ثالثًا: تقسيم وحصر الفيروسات المحمولة فى البذرة:

لقد حاول العالم Hansen عام ١٩٧٠ تقسيم الفيروسات المحمولة بالبذرة إلى مجموعات رئيسية، وكان ذلك بناء على شكل وحجم جزيئات الفيروس، فشملت:

١ – جزيئات كروية أو متعددة الجوانب (وهى فيروسات غير معروف أنها تنتقل عن طريق البذرة).

٢ – جزيئات عصوية الشكل.

٣ – جزيئات متعددة الأشكال غالبًا مستديرة.

٤ – جزيئات صغيرة جداً من نوع الفيرويد.

٥ – جزيئات غير معروفة.

رابعًا: إصابة البادرات عن طريق الفيروس المحمول خارج الجنين:

١ – الفيروس المحمول على سطح البذور:

من الواضح أن البذور الناتجة من النباتات المصابة جهازيًا سوف تحمل الفيروس كتلوث على سطح البذرة؛ خاصة فى حالة البذور المستخرجة من الثمار اللحمية أو الليفية مثل الطماطم – القاوون – البطيخ – الخيار، ومع ذلك لكى تنقل للجيل التالى، يكون من الضرورى للفيروس أن يبقى نشطًا أو فعالاً على سطح البذور؛ حتى تنبت ثم يتم الحصول على الفيروس من البذور المستخرجة من ثمار الطماطم المصابة باستعمال حمض الأيدروكلوريك.

٢ – الفيروس المحمول فى أجزاء البذرة خارج الجنين:

من المحتمل أن عدداً كبيراً من الفيروسات يوجد فى البذور فى بعض مراحل تكوينها، وحتى مع ذلك لا تنتقل بالبذرة – ففى مراحل تكوين البذور، تتحرك الكربوهيدرات إلى البذور كغذاء مخزن، وحيث يوجد دليل على أن حركة الفيروس فى اللحاء مرتبطة بانتقال الكربوهيدرات؛ فالفيروسات التى توجد بتركيز عالٍ فى اللحاء، من المتوقع أن تنتقل بكمية كبيرة إلى البذور، التى تملك أوعية متصلة بالنبات الأم، حيث تكون الحركة فى حالات

معينة أكثر تأثيراً فى إدخال أنواع معينة من الفيروسات إلى نسيج البذرة عن طريق الحركة خلال طرق الغزو العادية فى الأنواع المختلفة من الأنسجة البرانشيمية.

يوجد فيروس تجعد القمة فى بنجر السكر Sugarbeet Curly top virus بتركيز عالٍ نسبيًا فى بيريسيرم بذور نباتات البنجر المصابة، ولكن الأجنة المعزولة من البذور بعد بدء إنباتها لا تحتوى على الفيروس، بينما يحتوى باقى البذرة على الفيروس بكمية كبيرة.

كذلك وجد Sheffeld (١٩٤١) من دراسة المحتويات الداخلية لفيروس Tobacco etch virus أنه يصيب الغلاف، ولا يصيب الإندوسبرم أو الجنين فى بذور *Hyocyamus niger*.

وجد Crowley (١٩٥٧) أن فيروس موزايك الخيار (**CMV**) يوجد فى قصرة بذور الخيار، وفى قصرة وإندوسبرم بذور الخيار البرى، وفيروس موزايك الفاصوليا الأصفر Bean yellow mosaic virus يوجد فى قصرة بذور الفاصوليا وفيروس الذبول المبقع فى الطماطم Tomato spotted wilt virus فى غلاف بذرة الطماطم، وفيروس موزايك الفاصوليا العادى فى القصرة والجنين لبذور الفاصوليا، ومع ذلك يتم انتقال الفيروس عن طريق بذور الفاصوليا عن طريق الفيروس المحمول فى الجنين.

كذلك وجد Gold وآخرون عام (١٩٥٤) وجود جزيئات فيروسية فى إندوسبرم بذور الشعير المصابة بفيروس التخطيط الموزايكى فى الشعير، بتركيز عال، كما فى أنسجة الورقة، وهذا الفيروس يغزو الجنين وينتقل عن طريق البذور.

كذلك وجد Crowley سنة ١٩٥٧ فيروس موزايك الدخان فى غلاف بذور الفلفل الحريف. ووجد Taylor وآخرون سنة ١٩٦١، Broadbent سنة ١٩٦٥ أن فيروس موزايك الدخان يوجد بنسبة صغيرة فى إندوسبرم بذور الطماطم المصلبة.

ووجد Wilks and Gilmer عام ١٩٦٧ أن فيروس TMV ينتقل بنسبة عالية فى بذور التفاح والكمثرى و *Malus platycarpa*؛ حيث وجد الفيروس فى الشق البطنى من القصرة، ولم يحصل على الفيروس من الفلقات أو أجنة البذور الساكنة، ولكن أمكن الحصول على الفيروس من جنين وقصرة صنفين من أصناف التفاح.

وجدت نسبة عالية من بادرات الطماطم والفلفل المصابة بفيروس موزايك الدخان عند

شتل البادرات، ولقد استنتج Taylor وآخرون ١٩٦١ أن الشتلات النامية من بادرات ملوثة حيث يكون التلوث عادة على الجذور؛ حيث إنه عندسقوط غلاف البذرة فى التربة أثناء الإنبات يحدث تلوث للجذور والفلقتين بالفيروس، ولا تحدث الإصابة إلا إذا شتلت البادرات، حيث إنه أثناء عملية الشتل يتقاطع جزء من الجذور؛ مما يساعد الفيروس على الدخول لداخل النبات وإحداث الإصابة.

خامساً: انتقال الفيروسات التى تحمل فى الجنين:

يزداد عدد الفيروسات التى عرف أنها تصيب الجنين وتنتقل بذلك فى البذور، وعدد الأنواع النباتية التى تشترك فى انتقال الفيروسات عن طريق البذور فى السنين الحالية، فقد وجد Fulton عام ١٩٦٤ أن ٣٦ فيروساً ينتقل خلال ٦٣ نوعاً نباتياً، وهذا العدد يزداد باستمرار فى الأبحاث الحديثة.

وفى الجدول (٨ - ١) نأخذ فكرة عن بعض الفيروسات والأنواع النباتية، التى تنتقل خلال بذورها متضمناً النسبة المئوية للانتقال.

طرق إصابة الجنين:

يعتمد انتقال الفيروسات عن طريق البذور مع بعض الاحتمالات الشاذة على إصابة الجنين فى بعض مراحل تكوينه أو نموه - **وتحدث إصابة الجنين بإحدى الطرق التالية:**

١ - خلال إدخال الفيروس إلى الكيس الجنينى بواسطة الجاميطة المذكرة.

٢ - خلال غزو البويضة بواسطة الفيروس من النبات الأم.

٣ - خلال الغزو المباشر للجنين فى بعض مراحل نموه.

١ - إصابة الجنين عن طريق الطلع (حبوب اللقاح):

اقترح Reddick and Stewart (١٩١٨) أن فيروس موزايك الفاصوليا العادى يحمل فى حبوب اللقاح، ويمر من انبوبة الإنبات إلى القلم أثناء التلقيح، وتنتج الإصابة، كذلك وجد أنه عندما تلقح الأزهار السليمة بلقاح نباتات مصابة، يحدث انتقال للفيروس عن

طريق البذور؛ مما يدل على أن حبوب اللقاح تحمل الفيروس وتنقله إلى الجنين.

كذلك وجد Nelson and Down (١٩٣٣) فى دراسة انتقال فيروس موزايك الفاصوليا العادى BCMV، خلال البذور فى صنفين من الفاصوليا – عندما يكون نبات واحد مصاباً تكون نسبة الانتقال خلال البذور فى الجيل الأول حوالى ٢٥٪، وهذا يشير إلى أن التأثير متساوٍ فى الانتقال خلال حبوب اللقاح والمبيض فى الأصناف المختبرة، ومع ذلك بين Medina and Grogan عام (١٩٦١)أنه على الرغم من أن نسبة عالية من الانتقال عن طريق البذور وجدت خلال كل من حبوب اللقاح والمبيض، فإن كمية الانتقال خلال الآباء تعتمد كثيراً على صنف النبات المستعمل، ووجد Gold وآخرون جزيئات عصوية الشكل، ترتبط بالإصابة بفيروس التخطيط الموزايكى فى الشعير فى نباتات الشعير فى حبوب اللقاح والمتاع – حوالى ١٠٪ من البادرات الناتجة من بذور النباتات السليمة التى لقحت من نباتات مصابة أظهرت أعراض المرض. بينما كانت نسبة انتقال الفيروس خلال بذور النباتات المصابة أعلى من ذلك غالباً ٥٠٪ أو أكثر، لذلك كان انتقال هذا الفيروس خلال حبوب اللقاح أقل فاعلية من خلال البويضة، ومع ذلك يجب أن يؤخذ فى الاعتبار الصنف والظروف المختلفة.

فى حالة الفيروس Elm mosaic virus وجد أن نسبة الانتقال عن طريق البذرة تكون أكثر عند إصابة نبات الأم، عنها عند إصابة نبات الأب، فعندما يكون الأب مصاباً تكون نسبة الانتقال ٣٠,٥ ٪، وعند إصابة الأبوين تكون حوالى ٤٨٪.

كذلك فى حالة فيروس Lychnis ringspot virus تكون نسبة الانتقال بالبذرة عند إصابة الأب فقط ١٨,٦ ٪، وعند إصابة الأم تكون ٣٠,٧ ٪، وعند إصابة الأبوين تكون النسبة ٣٣,٦ ٪.

فى الفواكه ذات النواة الحجرية، يحدث انتقال للفيروسات عن طريق حبوب اللقاح، فقد وجد Gilmer & Way (١٩٥٨) انتقال فيروس النيكروزيس الحلقى فى الكريز عن طريق النبات المذكر المصاب إلى النبات المؤنث السليم.

توجد معلومات محدودة على أن الفيروسات التى لا تنتقل عن طريق البذور تغزو أيضاً

حبوب اللقاح، وقد يكون ذلك نتيجة أن حبوب لقاح كثير من النباتات تكون مقاومة بدرجة عالية أو منيعة لغزو الفيروس، حتى فى حالة الغزو العالى للفيروسات مثل فيروس موزايك الدخان TMV، وعلى الرغم من أن انتقال الفيروس إلى الجاميطة المؤنثة عن طريق حبة اللقاح عرف منذ أكثر من ٤٠ عامًا، إلا أنه توجد معلومات حالية للتساؤل عما إذا كان دخول الفيروس قاصراً على المبيض، أو يمكن أن يهرب ويصيب النبات الأم.

اقترح Reddick & Stewart (١٩١٨ و ١٩٣١) أن ذلك يحدث فى حالة فيروس موزايك الفاصوليا العادى؛ حيث ينتقل المرض من النباتات السليمة أو النباتات المصابة عن طريق حبوب اللقاح، ولكن الانتقال بهذه الطريقة فى الفاصوليا لم يثبت.

كذلك وجد Lister and Murant (١٩٦٧) انتقال فيروس البقع الحلقية فى الشليك عن طريق حبوب اللقاح.

وعلى الرغم من أن النتائج المبكرة فشلت فى إظهار انتقال الفيروسات إلى النبات الأم عن طريق حبوب اللقاح، فقد أعطت اختبارات أخرى دليلاً على أن ذلك ممكن أن يحدث، على الرغم من كونه نادراً.

يبدو الآن وجود دليل على أنه يحتمل هروب الفيروس من المبيض وغزوه للنبات الأم المثير فى ذلك ميكانيكية منع ذلك من الحدوث؛ فالفيروس يهرب من المبيض ولكن غير قادر على غزو الأنسجة المجاورة بمعدلات سريعة كافية، لكى تسمح للفيروس لكى يثبت نفسه ويتكاثر فى النبات الأم، ويعطى إصابة جهازية. معدل سرعة حركة الفيروس احيانًا توجد فى اللحاء، ويوجد دليل على أن هذه الحركة مرتبطة بانتقال الكربوهيدرات؛ حيث يكون من المتوقع أن الكربوهيدرات تتحرك أكثر أو أقل من اتجاه الثمار، وبذلك فإن سرعة غزو النبات الأم من المبيض بواسطة الفيروس تكون مستبعدة، وحتى إذا وصل الفيروس إلى اللحاء - غزو الأنسجة خارج اللحاء تكون محدودة؛ نتيجة لأن حركة الفيروس تكون بطيئة نسبيًا من خلية برانشيمية لأخرى، ومن المتوقع أن حركة الفيروس من مبيض الكريز كمثال - خلال الأنسجة المحيطة بهذه الطريقة ولأسفل خلال أنسجة الثمرة ثم إلى الأنسجة البرانشيمية - تتطلب وقتاً كبيراً، وفى كثير من الحالات فإن الثمار تنضج وتجمع، قبل أن

يحدث ذلك حتى إذا تحرك الفيروس خارج المبيض.

٢ - إصابة الجنين نتيجة غزو الفيروس للبويضة فى نبات الأم:

من الممكن أن نكتشف وجود أو غياب عدد من الفيروسات من الجاميطة المذكرة للنبات. ولكن من الصعب تقرير ذلك بالنسبة للجاميطة المؤنثة، ويبدو أن الفيروس الذى يستطيع غزو الجاميطة المذكرة أن يغزو أيضًا المؤنثة. فى كثير من حالات الانتقال عن طريق حبوب اللقاح يدخل الفيروس مباشرة إلى الكيس الجنينى، عن طريق أنبوبة حبة اللقاح أثناء عملية الإخصاب حيث يثبت ويصيب الجنين - وهكذا إذا أصبح الكيس الجنينى مصابًا خلال دخول الفيروس مباشرة بواسطة حبة اللقاح، ومن هذا يبدو أن المبيض سوف يصاب خلال غزو الفيروس للمبيض من الخلايا المجاورة فى نبات الأم فى مراحل مبكرة أو متأخرة من نمو المبيض.

يوجد دليل آخر على إصابة المبيض، وجد فى العلاقة بين الانتقال عن طريق البذور ووقت إصابة نبات الأم - حيث وجد Fajardo (١٩٢٨) أن نباتات الفاصوليا النامية من بذور نباتات مصابة بفيروس موزايك الفاصوليا العادى أعطت نسبة عالية من البذور المصابة عن النباتات المحقونة، خلال مراحل النمو الخضرى، ولم يجد انتقال عن طريق البذور فى البذور الناتجة من القرون المجموعة قبل إصابة نبات الأم.

استنتج Nelson أن الانتقال بالبذرة فى فيروس موزايك الفاصوليا يعتمد على قدرة الفيروس على الوصول للمبيض قبل الإخصاب أو بعد ذلك بقليل.

كذلك وجد Couch (١٩٥٥) أن نباتات الخس المحقونة بفيروس موزايك الخس Lettuce mosaic virus قبل التزهير، أعطت بذوراً قليلة مصابة بالفيروس عن النباتات المصابة بعد الزراعة مباشرة. أما النباتات التى أصيبت بعد التزهير لم تعط انتقال خلال البذور.

٣ - الإصابة خلال الغزو المباشر للجنين:

على الرغم من أن الانتقال بالبذور يعتمد على إصابة الجنين بالفيروس فى مرحلة مبكرة من تكوينه، حيث يغزو الفيروس الكيس الجنينى أولاً - بعض الملاحظات تشير إلى أن ذلك

لا يكون ضروريًا فى جميع الحالات.

على الرغم من أن Hagbory (١٩٥٤) وجد أن نباتات القمح المحقونة بفيروس التخطيط الموزايكى فى الشعير فى وقت طرد السنابل، لم تعط انتقالاً عن طريق بذورها، بينما وجد اختلافًا فى النتائج المتحصل عليها مع هذا الفيروس فى حالة الشعير – حيث وجد أن نسبة الانتقال عن طريق البذور تصل إلى ٦٣٫٧ ٪ فى حالة البذور المصابة فى مرحلة النضج، ثم تهبط، ولكن تبقى بالمعدل نفسه فى مرحلة طرد السنابل والطور العجينى الصلب.

استنتج Crowley (١٩٥٩) أن إصابة الأجنة الصغيرة المتكونة فى الشعير بفيروس التخطيط الموزيكى محتملة، على الرغم من أن نسبة عالية من الإصابة وجدت عندما حقنت النباتات قبل التزهير فقط.

هذه النتائج تدل على أن نباتات معينة وبعض الفيروسات تكون قادرة على غزو المبيض أو الكيس الجنينى – كما فى حالة الإصابة المتأخرة فى الشعير المصاب بفيروس التخطيط الموزايكى، حيث يحتمل غزو الجنين حتى بعد وصوله إلى مرحلة النضج.

سادسًا: أمراض البذور المتسببة عن الفيروسات:

أحسن أمثلة لتأثير الفيروس على موت جنين البذرة فيروسات Tomato aspermy virus وموزايك الفاصوليا الجنوبى، حيث يسببان موتاً للبذور وعقماً للأزهار (Inouye, 1962). ولقد ذكر أيضًا Seth (١٩٦٢) أن الفيروس Pigeon pea sterility mosaic الذى ينتقل عن طريق الحلم، ولا ينتقل خلال البذور، ورغم ذلك يؤدى لعقم بذور الـ Pigeon pea، وكذلك تؤثر فيروسات أو ميكوبلازما Citrus spiroplasma فى أنواع عديدة من الموالح المصابة، على الرغم من عدم انتقالها عن طريق بذورها.

وهناك عديد من الأمثلة على الفيروسات المحمولة بالجنين وتأثيرها على خفض حيوية البذور خصوصًا البقوليات مثل البسلة المصابة بفيروس Pea early browning تصبح البذور مجعدة، وتميل القصرة إلى اللون الرمادى المائل للخضرة، وتصبح بذور اللوبيا المصابة بفيروس موزايك اللوبيا صغيرة ومجعدة (Phatat and Summanwar, 1967.)، وتصبح

بذور البسلة المصابة بفيروس موزايك اللوبيا المحمول بالبذرة مجعدة، وتتلون قصرة بذور فول الصويا المصابة بفيروس موزايك فول الصويا تتلون بتبرقش لونه بنى أو أسود عند منطقة السرة، وتصبح البذور أصغر فى الحجم من البذور السليمة (Phatat, 1974). وتتلون قصرة بذور فول الصويا المصابة بفيروس تقزم فول الصويا بتبرقش واضح، وكذلك بذور الـ mung bean المصابة بفيروس Mung bean mosaic ، حيث تأخذ مظهر التجعد والتكرمش (Phatat, 1974)، أما بذور الفول السودانى المصابة بفيروس تبرقش الفول السودانى فتكون ملونة وأصغر فى الحجم من البذور السليمة، وكذلك حبوب الشعير المصابة بفيروس الموزايك المنقط فى الشعير، والتى تكون مجعدة وأصغر فى الحجم من السليمة.

يسبب فيروس موزايك قصب السكر الذى ينتقل خلال بذور الذرة السكرية نكروزيس فى النورات أما البذور فتصبح مجعدة وأصغر فى الحجم عن السليمة، كذلك تصبح بذور القرعيات *Cucurbita pepo* المصابة بفيروس موزايك الكوسة أخف من البذور السليمة وضعيفة ومشوهة (Middleton, 1944). وفى تجربة لبعض بذور الخس السليمة عن المصابة كان ذلك بناء على الوزن، كذلك وجد أنه فى عديد من الأصناف يؤدى فيروس موزايك الخس لحدوث نكروزيس على البذور، ونقص فى قدرتها على الإنبات.

- وتؤثر الإصابة بفيروسات BYMV & CMV على بذور الترمس، وتؤدى لصغرها فى الحجم وبالنسبة للأزهار التى تحملها تكون مكرمشة، وتعطى قروناً قليلة مشوهة تحتوى على بذور قليلة حاملة للفيروس (Troll, 1957).

- وفيروس موزيك الدخان (السلالة التى تصيب الطماطم) يسبب نكروزيس على بذور الطماطم وتأخذ اللون الأسود (Broadbent, 1965).

- بعض الفيروسات تؤثر مباشرة على حيوية البذور مثل فيروس موزايك الخس والسلالة الخفيفة للفيروس، المنتقل خلال بذور حشيشة الدينار يؤدى لنقص فى نسبة الإنبات حوالى ٢٠٪، وقد يصل إلى ٩٠٪ (Blattny & Osvald, 1957) بـذور الـ *Spergula arvensis* المصابة بفيروس الحلقة السوداء تنبت ببطء عن البذور السليمة، ولكنها تعطى

تأثيراً ضئيلاً، أو لا تؤثر على البادرات (Lister & Murant, 1963).

سابعًا : العوامل التى تمنع انتقال الفيروسات عن طريق البذور:

على الرغم من الطبيعة الجهازية لأغلب الفيروسات المعدية، إلا أن الانتقال عن طريق البذور غير دائم الحدوث، وذلك بسبب ما يلى:

١ – فقد الفيروس فاعليته أو تثبيطه فى الجنين.

٢ – الفيروس يميت أو يشوه الجاميطات، وهذا يسبب عقم الجاميطات ويمنع إنتاج البذرة المصابة بالفيروس.

٣ – عدم مقدرة الفيروس على إقامة علاقة توافق مع الجاميطات، ولقد وجدت هذه الفيروسات فى الأجزاء الزهرية والبذور غير الناضجة، ولكن عند وجودها فى البذور الناضجة توقف نشاطها.

٤ – عدم مقدرة الفيروس على إصابة الأجنة الصغيرة، إما بسبب مقاومة الجنين للإصابة أو عدم مقدرة الفيروس على إصابة الجاميطات المذكرة أو المؤنثة قبل تكوين الجنين.

وهذا يبين أيضًا أن الفيروسات التى تكون قاصرة على الحزم الوعائية لا تستطيع الانتقال خلال البذور، حيث لا يوجد اتصال وعائى بين الجنين والنباتات الأم – وذلك يفسر حقيقة أن الانتقال بالبذور يكون قاصراً على الفيروسات، التى تكون قادرة على غزو الأنسجة البرانشيمية.

وتبعًا للعالم كراولى Crowley (1957):

توجد ٣ أقسام من الفيروسات التى يستحيل انتقالها خلال البذور، وهى:

١ – الفيروسات التى تقتل عوائلها.

٢ – الفيروسات التى تمنع تكوين الأزهار.

٣ – الفيروسات التى يكون انتشارها فى النبات العائل محدوداً.

ولقد ذكر Bennett (1969) العوامل المحددة لانتقال الفيروس عن طريق البذور، وهى

كما يلى:

١ - تثبيط الفيروس فى الجنين:

هناك احتمال كما اقترح Duggar (١٩٣٠) بأن المثبطات الموجودة فى البذور سوف تؤثر على الانتقال خلال البذور مثال ذلك: وجود أنواع خاصة من البروتينات أو مواد معينة أخرى فى البذرة ربما تمنع انتقال فيروس TMV عن طريق البذور.

ولقد اقترح Caldwell (١٩٦٢) أن الجنين بيئة غير صالحة لتكاثر الفيرس، بسبب وجود كمية قليلة من المواد الفسفورية ذات الطاقة العالية، اللازمة لتضاعف الفيروس؛ حيث إنه اثناء عملية الانقسام الميتوزى، تحتاج الخلية النامية إلى كمية كبيرة من هذه المواد، ونتيجة ذلك فإنه فى المراحل الأولى من تكوين الجنين يستخدم هذه المواد، وبالتالى لا يستطيع الفيروس التكاثر ويثبط فى النهاية، وربما أفضل مثال على توقف نشاط الفيروس فى القدرة هو ما ذكره العالمان Zaumeyer & Harter عام (١٩٤٣) على فيروس موزايك الفاصوليا الجنوبى فى الفاصوليا؛ حيث استردا الفيروس من بذور الفاصوليا فى الطور اللبنى والطور العجينى المبكر، ومن البذور حديثة النضج، ولكن فشلا فى استرداده من البذور المخزنة لمدة ٧ شهور.

كذلك ذكر Cheo (١٩٥٥) أن فيروس موزايك الفاصوليا الجنوبى يصيب الجنين الصغير، ويزداد تركيزه بنضج الجنين، بينما يهبط تركيز الفيروس لمستوى منخفض، أو يصل إلى الصفر عند جفاف البذور، وذلك بتغيير التركيب الكيماوى فى الجنين. فالبادرات النامية من البذور غير الناضجة اعطت نسبة إصابة ٥٨-٨٠٪ عند إنباتها على ورق ترشيح، بينما البادرات الناتجة من بذور ناضجة أحيانًا لا تحتوى على الفيروس، كذلك وجدت كمية كبيرة من المواد المثبطة للفيروس فى العصارة المستخلصة من البذور الناضجة عن المستخلصة من البذور غير الناضجة.

٢ - عقم الجاميطات:

التأثر المباشر للفيروس على الجاميطات أو الجنين يؤدى لمنع تكوين أو إنتاج بذور مصابة

- حيث وجد ذلك فى عدد محدود من الحالات.

يسبب فيروس البقع الحلقية فى الدخان Tobacco ringspot virus عقم حبوب اللقاح، ويقلل محصول البذور، ولكن لا يؤثر الفيروس على المبيض. هناك حالة أخرى مشابهة وجدت فى فيروس موزايك الخس Lettuce mosaic virus - فى الخس - حيث يسبب هذا الفيروس درجة عالية من عقم حبوب اللقاح، ويحدث الانتقال بواسطة حبوب اللقاح بقلة جداً - ولكن الانتقال عن طريق المبيض لا يتأثر بالدرجة نفسها - كذلك لفيروس To-mato aspermy virus على الطماطم تأثير مباشر ومميت على حبوب اللقاح والبويضات؛ حيث يتدخل فى عمليات الانقسام العادى للجاميطة المذكرة والجاميطة المؤنثة، ويمنع تكوين البذور فى النباتات المريضة (Caldwell, 1952). ووجدت نسبة عالية من حبوب اللقاح العقيمة فى الشعير عند إصابتها بفيروس التخطيط الموزايكى فى الشعير Barley stripe mosaic virus، ووجد Inouye (١٩٦٢) نقصاً فى عدد البذور المخصبة فى القمح المصاب بهذا الفيروس فى اليابان، وذلك بنسبة ٢٠-٥٠٪، ولكن لم يوجد نقص كبير فى نسبة البذور المصابة.

اقترح Couch (١٩٥٥) أن غياب الانتقال خلال بذور الخس المصابة بفيروس موزايك الخس فى الصنف Chestnut Early Giant يرجع إلى أن الأزهار التى تنشأ على الفرع الأصلى تموت بمجرد تكوينها نتيجة للإصابة بالفيروس، والأزهار التى تتكون على الأفرع الثانوية تكمل نموه وتكون البذور الناتجة منها خالية من الفيروس.

٣ - قابلية الجاميطات للإصابة بالفيروس:

إن الدراسات السيتولوجية والتشريحية والعوامل الأخرى التى لها علاقة بظهور أجيال خالية من الفيروس لعديد من النباتات المصابة بالفيروس، تم دراستها بواسطة عديد من العلماء. فوجد أنه من الواضح أن خلو الجاميطات الناتجة من النباتات المصابة جهازياً من الإصابة تعزى إلى مقاومة الجاميطات وراثياً لغزو الفيروس وتكاثره أو هروبها من الإصابة اثناء عملية الحماية الميكانيكية، ولقد ذكر للمؤلف Medina & Grogan (١٩٦١) وجود دليل على أنه فى بعض الحالات تكون الجاميطة المؤنثة منيعة للإصابة بالفيروس، فعند تلقيح

صنفين من الفاصوليا، بهما عامل المقاومة سائد مع أصناف أخرى حساسة للإصابة، لم يحدث انتقال خلال البذور.

وعلى الرغم من أن الجاميطات لها تأثير على تثبيط الفيروسات، وبذلك تقلل أو تمنع الانتقال عن طريق عدم قدرة الفيروسات على الغزو الكامل للمرستيم الأولى.

يسمح التأخير فى غزو الأنسجة المرستيمية بواسطة الفيروس للجاميطات الناشئة أن تكون خالية من الفيروس، وبعض الفيروسات يكون فى استطاعتها غزو الأنسجة المرستيمية، ولكن لا يمكنها أن تعيش فى الخلايا البرانشيمية، وذلك يكون سبب فقد الفعالية أثناء عملية النضج للخلية، وهذا الفقد فى الفاعلية من المتوقع أن يؤثر وربما يمنع الانتقال بالبذرة.

هروب طلع خلية الأم من غزو الفيروس بواسطة تأخير غزو المرستيم، وبالتالى هروب حبوب اللقاح من الغزو أثناء النمو السريع غير صعب الملاحظة، ورغم ذلك غير واضح لماذا يوجد مدى واسع من إصابة الطلع باختلاف العائل/ فيروس.

٤ - وقاية الجنين من الإصابة بالفيروس:

بالإضافة لميكانيكية وقاية الجاميطات المذكرة والمؤنثة للإصابة، توجد أيضًا ميكانيكية وقاية الجنين اثناء مراحل تكوينه من الإصابة المجاورة، التى تحتوى على كمية كبيرة من الفيروس نتيجة إصابة النبات جهازيًا.

عند تكوين الجنين باتحاد البويضة مع حبة اللقاح غير المعدية، فإن الجنين يبدأ فى التكوين فى بيئة خالية من الفيروس. ولا توجد روابط بروتوبلازمية بين الجنين والخلايا المجاورة، ويصبح الجنين تركيباً طفيليًا قادراً على النمو والتكوين، عن طريق امتصاص المواد الغذائية من نبات الأم، ولقد وجد أن الجنين يستطيع امتصاص المواد الغذائية من المنطقة المحتوية على كل من المواد الغذائية والفيروس، دون حدوث إصابة، وفى هذه الحالة يكون جدار خلايا الجنين هو المانع لمرور الفيروس مع المواد الغذائية.

يوجد دليل فى حالات قليلة على أن الفيروس قادر على المرور خلال البناء السيليلوزى

لجدار الخلية، كما وضح Kassanis (١٩٥٨) فى مزارع الأنسجة أنه مع هذه المقدرة على الحركة خلال جدار الخلية، يظهر جنين نبات الفاصوليا مقاومة عالية ضد غزو الفيروس، وتبعًا للعالم Crowley (١٩٥٩) وجد أن فيروس موزايك الفاصوليا الجنوبى Southern bean mosaic virus يصيب جنين الفاصوليا بعد ٤ أيام من التزهير، وليس بعد ٧ أو ١٠ أيام. كذلك فى حالة فيروس التخطيط الموزايكى فى الشعير، ينتقل خلال البذور، حتى إذا حدثت العدوى فى أوقات متأخرة حتى فى الطور العجينى من تكوين البذور - كما وجد Crowley (١٩٥٩) على الفيروس نفسه أن اصابة الأجنة الصغيرة التكوين تظهر محتملة فى بعض أصناف الشعير، ولكن نسبة عالية من الانتقال بالبذرة، وجدت عند إصابة النباتات قبل التزهير.

وعلى الرغم من أنه فى حالات نادرة تظهر الفيروسات قدرة على الحركة خلال الجدار السيلولوزى الخلوى، لكن ما زالت حركة الفيروس خلال الخيوط البرتوبلازمية التى تصل الخلايا المجاورة فى الأنسجة البرانشيمية هى الطريق المفضل لها.

معدل انتقال الفيروس خلال البذور:

هناك عديد من العوامل التى تؤثر على معدل انتقال الفيروس خلال البذور، نذكر منها:

١ - ميعاد إصابة النباتات وتأثيره على نسبة البذور المصابة:

فى عديد من الأمراض الفيروسية توجد علاقة ثابتة ما بين ميعاد عدوى المحصول وكمية البذور المصابة، والتى تنقل الفيروس. فلقد وجد كل من Athow & Bancroft (١٩٥٩) علاقة مابين نسبة انتقال فيروس التبقع الحلقى فى الدخان ببذور فول الصويا، ووقت ملاحظة الأعراض الأولية على النباتات فى الحقل، فوجد أن الإصابة المبكرة بناء على ملاحظة الأعراض تعطى نسبة مئوية عالية فى نقل الفيروس خلال البذور، بعكس الإصابة المتأخرة أثناء أو فى نهاية مرحلة التزهير؛ إذ تعطى نسبة مئوية منخفضة فى النقل. وهذه الملاحظة عن تأثير عمر النباتات ووقت العدوى ومعدل النقل بالبذرة تأكدت عن طريق (Crowley & Francki, 1968).

ووجد Fajardo (١٩٣٠) أن فيروس BCMV ينتقل خلال بذور الفاصوليا فقط، عندما تكون النباتات الأم مصابة قبل مرحلة التزهير. وكذلك فيروس موزايك اللوبيا المحمول بالمن يقل معدل انتقاله خلال بذور اللوبيا، كلما زاد عمر النبات الأم؛ حيث إنه عند تأخير العدوى لعشرة أيام قبل التزهير أو بعد تزهير المحصول، لا ينتقل الفيروس خلال البذور.

٢ - تأثير العوامل البيئية على نسبة الانتقال خلال البذور (خاصة درجة الحرارة):

أوضحت الدراسات التى أجريت فى هذا المجال أن نسبة الانتقال خلال البذورتتأثر بالعوامل البيئية، التى يتم تحتها إنتاج هذه البذور خصوصًا درجة الحرارة.

ووجد العالم Crowley (١٩٥٧) أن نسبة انتقال فيروس عن طريق بذور الفاصول تتراوح ما بين صفر - ٢٥٪ عند تنمية النباتات المصابة، تحت مستويين من درجات الحرارة؛ ففى حالة تنميتها تحت درجة ٦٢ - ٦٥ فرنهيت، لم يحدث انتقال بالبذرة بعكس فى حالة تنميتها على درجة ٦٨ درجة فهرنهيت، كانت نسبة الانتقال خلال البذور ١٦ - ٢٥٪. كما قام Singh وآخرون (١٩٦٠) بعمل دراسات على تأثير درجة الحرارة على انتقال فيروس التخطيط الموزايكى فى الشعير BSMV، عن طريق بذور أربعة أصناف من الشعير، تتحمل الإصابة بالفيروس، فوجدوا أنه عند تنمية النباتات فى ١٦ ْم، حدث انتقال للفيروس خلال بذور صنف واحد بنسبة ٣٪، ولم ينتقل خلال الثلاث أصناف الأخرى. أما عند تنمية النباتات على درجة ٢٠ ْم حدث انتقال عن طريق بذور الأربعة أصناف بنسبة ٩-٢٧٪، وعند تنميتها على درجة ٢٤ ْم، حدث انتقال عن طريق البذور يتراوح ما بين ٧-٢٨.

٣ - تأثير شدة الأعراض على نسبة الانتقال خلال البذور:

هناك دليل على أن نسبة انتقال الفيروس عن طريق البذور مرتبطة لحد ما بشدة الأعراض، وأن شدة الأعراض ترتبط بتركيز الفيروس، وحيث إن التركيز المنخفض من الفيروس النامى ببطء مما يسمح للجاميطات النامية بالهروب من الإصابة، وكل ما سبق فروض تحتاج لمزيد من الدراسة والأدلة.

٤ – تأثير الفيروس والسلالة الفيروسية على النقل بالبذرة:

تختلف نسبة الانتقال خلال البذور باختلاف الفيروس، فقد وجد أن نسبة انتقال فيروس التبقع الحلقى فى الدخان خلال بذور فول الصويا تصل إلى ١٠٠ ٪، وفى حالة نباتات الخس المصابة بفيروس موزايك الخس تصل إلى ٣–١٠٪.

كذلك تختلف نسبة الانتقال عن طريق البذور باختلاف سلالات الفيروس الواحد، فقد وجد العالمان Grogan & Schnathorst, 1955 أن « السلالة ٩٨ » من فيروس التبقع الحلقى فى الدخان Tobacco ringspot virus تنتقل بنسبة ٣٪ خلال بذور صنف الخس Raris Island cos، بينما السلالة "Calico" من الفيروس نفسه لا تنتقل عن طريق بذور الصنف نفسه.

٥ – تأثير اختلاف أنواع واصناف العائل على نسبة الانتقال خلال البذور:

فقد وجد أن الفيروس قد ينتقل خلال بذور نوع من النبات، ولا ينتقل خلال بذور نوع آخر تابع للجنس نفسه، مثال: ينتقل فيروس موزايك الدخان TMV خلال بذور الطماطم والفلفل والدخان، ولا ينتقل خلال بذور أنواع أخرى.

كذلك ينتقل فيروس موزايك الخيار CMV خلال بذور الخيار البرى بنسبة ١٠٪، بينما فى بذور الخيار المنزرع تقل النسبة كثيراً عن ذلك، كذلك فإن فيروس موزايك الكوسة ينتقل خلال بذور الأنواع المختلفة من القرعيات بنسبة تتراوح ما بين صفر إلى ٣٠,٧ ٪.

ووجد أن فيروس موزايك فول الصويا SMV ينتقل بنسبة ٢١,٤٪ خلال بذور *Atriplex pacifica* ، بينما لا تنتقل خلال بذور ٥ أنواع أخرى من جنس Atriplex نفسه.

كذلك تختلف نسبة الانتقال بالبذرة باختلاف الأصناف التابعة للعائل نفسه، كما فى حالة فيروس موزايك الخس، الذى لا ينتقل خلال بذورالصنف Cheshnut Early Giant، بينما ينتقل بنسب مختلفة تتراوح ما بين ١–٨٪خلال بذور الأصناف الأخرى من الخس.

ثامناً: تثبيط الفيروس فى البذور:

١ – بالنسبة لدرجات الحرارة قد تستخدم درجات الحرارة العالية فى استبعاد الفيروس من

البذور، ولكن أحيانًا لا يكون للحرارة العالية تأثير على استبعاد الفيروس فمثلاً فى حالة فيروس موزايك القاوون وفيروس موزايك الفاصوليا، على الرغم من عدم تحمل هذين الفيروسين للحرارة العالية فى الأنابيب، إلا أن استعمال درجة حرارة عالية عن الدرجة الموقفة للنشاط الباثولوجى فشلت فى استبعاد هذه الفيروسات من البذور؛ حيث وجد أن الفيروسات تكون أكثر مقاومة لدرجات الحرارة العالية فى البذور الجافة عنها فى الأنابيب، وقد يكون سبب ذلك وجود ماء قليل ومحتوى عالٍ من البروتين.

ولقد بذلت محاولات كثيرة لاستبعاد الفيروس من البذرة، وذلك باستخدام درجات حرارة عالية نوعًا لفترات قصيرة نسبيًا.

٢ - باستخدام الطرق الكيماوية لاستبعاد الفيروسات خاصة التى توجد على سطح البذور أو المناطق القريبة من السطح، كما فى حالة فيروس موزايك الدخان ؛حيث وجد Taylor et al (١٩٦١) أنه يمكن استبعاد هذا الفيروس من بذور الطماطم بمعاملتها بالتراى صوديوم فوسفات (ص٣ فوا ٤)، أو باستخراج البذور من الثمار المصابة باستخدام الأحماض المخففة مثل حمض الهيدروكلوريك (يدكل)، أو باستخراج البذور من الثمار بطريقة التخمير.

- ولقد وجد أن مركبات السيتوكينيتات لها تأثير مثبط على تضاعف بعض الفيروسات النباتية، وقد وجدت نسبة مرتفعة من هذه المركبات فى بذور الذرة، ومن المحتمل أنها تلعب دوراً فى مقاومة انتشار بعض الفيروسات فى البذور والثمار.

- وقد تستخدم بعض المواد الكيماوية، ومنها المضادات الحيوية فى مقاومة بعض الفيروسات، كما فى بذور الخيار، أو تستخدم بعض المواد الكيماوية فى رش الحقول التى تخصص لإنتاج التقاوى، ومن هذه المواد : 8-azaguanine وكذلك 2-thiouracil.

٣ - كذلك يفقد الفيروس نشاطه بتخزين البذور، فلقد وجد Middleton & Bohn (١٩٥٣) أن فيروس موزايك القاوون muskmelon mosaic vrius تنخفض نسبة انتقاله عن طريق البذور من ٩٥٪ فى البذور الطازجة إلى ٥٪ فى البذور المخزنة لمدة ٣ سنوات - كذلك وجد Middleton (١٩٤٤) أنه لايوجد اختلاف فى نسبة انتقال

فيروس موزيك الكوسة فى بذور الكوسة بعد فترة قصيرة من جمعها، وبعد ٣ سنوات أخرى.

ووجد Fulton (١٩٦٤) أن نسبة انتقال فيرس النيكروز الحلقى فى الكريز عن طريق البذور ظلت ثابتة من ٦٠-٧٠٪ فى السنين الأربعة الأولى من التخزين على درجة حرارة ٢مْ، ولكنها انخفضت لأقل من ٥٪ فى السنة السادسة، ووجد فى هذه الحالة فقداً قليلاً فى حيوية البذور.

وجد أن التخزين لا يؤثر على نشاط فيروسات أخرى فى البذور، حيث وجد Nelson (١٩٣٢) كمية الانتقال نفسها عن طريق البذور فى فيروس موزايك الفاصوليا العادى فى بذور الفاصوليا الطازجة والبذور المخزنة لمدة ٣ سنوات.

ولم تجر دراسات كافية على علاقة محتوى البذرة من الفيروس بحيوية البذرة نفسها، ولكن لايوجد هناك دليل على أن حيوية البذرة تتأثر بوجود الفيروس.

ولمقاومة الأمراض الفيروسية التى تنتقل عن طريق البذور، يتم إجراء بعض المعاملات، منها:

١ - التخلص من النباتات المصابة فى الحقل مبكرًا كلما أمكن ذلك.

٢ - إنتاج بذور خالية من الفيروس واستخدامها فى الزراعة.

٣ - كذلك يمكن مقاومة الانتقال عن طريق البذور بواسطة العوامل الوراثية، التى يمكن الاستفادة منها فى برامج التربية لتقليل أو استبعاد الفيروسات عن البذور فى نباتات محصول معين، حيث يكون النجاح فى مثل هذه البرامج عظيم الفائدة فى مقاومة الأمراض الفيروسية لإنتاج أصناف مقاومة.

تاسعًا: طرق اختبار البذور الحاملة للفيروس:

١ - الفحص الخارجى:

فى حالة الإصابة ببعض الفيروسات كما فى إصابة بذور فول الصويا Soybean mosaic

virus قد تظهر التغيرات المرضية فى صورة خطوط ملونة بلون بنى داكن أو أسود، تخرج من منطقة السرة وتحيط بالبذرة فى شكل حزم أو اشعة. وفى الغالب لا تظهر أعراض الإصابة بالأمراض الفيروسية على البذور؛ مما جعل البذور المصابة تبدو مثل السليمة.

٢ - زراعة البذور:

تعقم البذور حتى تموت الكائنات الدقيقة إن وجدت على سطح البذور، ثم توضع البذور فى جو رطب بأن تحضر أطباق بترى بها ورق ترشيح مبلل، ثم توضع البذور بالطبق، وتحضن الأطباق حتى يتم الإنبات، ثم تزرع البذور فى تربة معقمة فى أصص، وتوضع فى الصوبة الزجاجية أو فى مكان معزول عن الحشرات، التى تلعب دوراً مهماً فى نقل الأمراض الفيروسية. وتترك البذور حتى مرحلة الإنبات وظهور الأوراق الثلاثية، التى من المحتمل أن تظهر عليها اعراض الإصابة الفيروسية إن وجدت، وبالتالى يمكن تحديد مظهر الإصابة ونسبة الإصابة.

٣ - الطريقة التشريحية:

وهى مفيدة فى حالة الإصابة بالأمراض الفيروسية، حيث إن الإصابة بالفيروس تحدث تغييرات داخلية بالأنسجة، وعلى ذلك تثبت العينة فى محلول المثبت المناسب، ثم تعمل فيها قطاعات يدوية أو بالميكروتوم، وتصبغ الصبغات المناسبة وتختبر ميكروسكوبياً.

٤ - الطريقة السيرولوجية:

وهى من الطرق المهمة لاختبار الإصابة بالأمراض الفيروسية.

جدول (٨ - ١) : أمثلة الفيروسات التى تنتقل فى بذور بعض النباتات.

الفيروس	النبات العائل المختبر	النسبة المئوية للنقل
١ - فيروس موزايك البرسيم الحجازى	البرسيم الحجازى	١-٥
(Alfalfa mosaic virus)		حتى٦
٢ - فيروس موزايك الشعير	الشعير	٢-٤٥
(Barley mosaic virus)		
٣ - فيروس الموزايك المخطط فى الشعير	الشوفان	صفر-٩,٥
(Barley stripe mosaic virus)	الشعير	٥٨
٤ - فيروس موزايك الفاصوليا العادى	الفاصوليا	٥٠
(Bean common mosaic virus)	*Vigna sesqupedalis*	٣٧
٥ - فيروس موزايك الخس	الخس	٣,١
(lettuce mosaic virus)	*Senecio vulgaris*	٢,٣
٦ - فيروس اصفرار حواف الأوراق فى الفول السودانى	الفول السودانى	٣٠-١٠٠
(Peanut marginal chlorosis virus)		
٧ - فيروس تبرقش الفول السودانى	الفول السودانى	٢
(Peanut mottle virus)		
٨ - فايرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس	الطماطم	٢-١١
(Potato spindle tuber viroid)	البطاطس	٨٧-١٠٠
٩ - فيروس موزايك فول الصويا	فول الصويا	صفر-٦٨
(Soybean mosaic virus)	فول الصويا	(١-١٨)
١٠ - فيروس موزايك الكوسة	الشمام	٦,٦-٢٠
(Squash mosaic virus)	الكوسة	٢,٢
	البطيخ	١,٥
١١ - فيروس موزايك الدخان	الفلفل	٢٢
(Tomato mosaic virus)	الطماطم	٢
<u>Vitis</u> spp.	العنب	٢٠
١٢ - فيروس الذبول المبقع فى الطماطم	*Senecis cruentus*	حتى ٩٦
(Tomato spotted wilt virus)		
١٣ - فيروس موزايك الخيار	الخيار	«اثار»
Cucumber mosaic virus	الخيار البرى	٩,١
	الطماطم	٠,٢
	اللوبيا	٤-٨

خامساً : الانتقال عن طريق التربة : Soil transmission

تنتشر بعض الأمراض الفيروسية خلال التربة؛ أى إن الإصابة تحدث فى أجزاء النبات تحت سطح التربة. فى هذه الأمراض لايعرف لها ناقل آخر عن طريق إصابة الأجزاء الخضرية، ويطلق على هذه المجموعة من الفيروسات بالفيروسات المحمولة فى التربة، ويمكن تعريف هذه المجموعة بأنها: « تنتشر انتشاراً طبيعيًا تحت سطح التربة، ولا تعتمد فى إصابة النبات على تلامس أنسجة النبات المصاب بأنسجة النبات السليم»؛ أى إن انتقال وانتشار الفيروسات عن طريق التربة إما لوجود الفيروس فى التربة ودخوله إلى انسجة النبات عن طريق الجروح، أو أن يحمل أو ينتقل إلى انسجة النبات بواسطة بعض الكائنات الدقيقة مثل الفطر والبكتريا، والحيوانات مثل النيماتودا، وبعض الحشرات مثل بعض أنواع المن التى تصيب الجذور.

وكان أول دليل على انتقال أحد الفيروسات عن طريق التربة هو ما قام به Beijerinck سنة ١٨٩٨، عندما زرع نباتات دخان سليمة فى تربة مأخوذة من حول جذور نبات دخان مصاب بفيروس تبرقش الدخان (TMV) فحدثت الإصابة. وكذلك دلت تجارب Smith سنة ١٩٣٧ على أن فيروس نيكروزيس الدخان Tobacco necrosis virus ينتقل من التربة الملوثة إلى جذور نبات الدخان البرى *N.glutionsa*، ولكن هذا الفيروس لا يتحرك فى الساق إلى أجزاء النبات الموجودة فوق سطح التربة. وحديثًا ثبت أن نوعًا معينًا من فيروسات موزايك القمح يمكنها أن تصيب القمح من خلال التربة الملوثة. وقد وجد Mckinney سنة ١٩٣٧ أن موزايك القمح يظهر عندما يزرع القمح فى تربة ملوثة، ويمكن منع الإصابة بمعاملة التربة بالفورمالين، والتربة النظيفة يمكن تلويثها بخلطها بتربة ملوثة، وليس بخلطها بأوراق من نبات القمح المصاب. وقد وجد أن الفيروس أكثر انتشاراً فى التربة الثقيلة عن التربة الخفيفة، وقد ذكر أن الفيروس يعيش فى بعض الأنواع المناسبة من التربة إلى أكثر من ٩ سنوات.

وينتقل فيروس انتفاخ العروق فى الخس Bigvein virus أيضًا خلال التربة، ويشبه فيروس موزايك القمح فى عدة نواحٍ؛ حيث إنه أكثر انتشاراً فى التربة الثقيلة عن التربة

الخفيفة، ويزداد وجوده مع زيادة رطوبة التربة، ويبقى الفيروس لمدة أكثر من سنة، ويمكن منع الإصابة بتعقيم التربة بالتبخير.

وتحتوى مجموعة الأمراض الفيروسية التى تنتقل وتنتشر عن طريق التربة على أكثر من ٢٠ فيروسا، إلا أنه توجد أمراض فيروسية كثيرة لايعرف طرق انتقالها وانتشارها، ومن المحتمل أن تكون من ضمن هذه المجموعة بعض الفيروسات التى تنتقل عن طريق التربة، هذا بالإضافة إلى أن بعض الفيروسات التى يعرف طرق انتقالها وانتشارها قد تنتقل وتنتشر أيضًا، باستخدام إحدى وسائل طرق الانتقال تحت سطح التربة.

ويمكن تلخيص طرق الانتقال والانتشار عن طريق التربة فى الآتى:

١ - الانتقال بواسطة النيماتودا:

لوحظ أن بعض الأمراض الفيروسية تظهر على النباتات فى الحقل كمجموعات من النباتات المصابة فى أماكن متفرقة فى الحقل، وقد وجد أن هذه الأماكن تحتوى على نيماتودا مما جعل البحث يتجه لمعرفة مدى علاقة هذه النيماتودا وانتشار تلك الأمراض الفيروسية. وقد تمكن **Hewitt et al** سنة ١٩٥٨ من إثبات أن مرض **Grapevine fan leaf** يمكنه أن ينتقل من نبات عنب مصاب بالمرض إلى نبات سليم، كليهما مزروع فى وعاء واحد، إذا أضيف إلى التربة النيماتودا الخنجرية *Xiphinema index*. ولكن لا ينتقل المرض إلى النبات السليم، إذا تركت النباتات المصابة والسليمة أى مدة دون إضافة هذه النيماتودا. ومعروف حاليًا حوالى ٢٠ نوعًا **species** من النيماتودا تعمل كناقلات للفيروسات النباتية.

ومن الفيروسات الأرضية مجموعتان فقط هى التى ثبت حتى الآن انتقال بعض سلالاتها بواسطة النيماتودا. وهى الفيروسات المتساوية الأبعاد (كروية):

١ - مجموعة فيروسات التبقع الحلقى: Nepoviruses: Ring spot viruses (RSV)

ومنها فيروس الورق المروحى فى الكروم (GFV) وتنقله النيماتودا الخنجرية ***Xiphinema index*** وفيروس التبقع الحلقى فى القرنفل **CrRSV**، وتنقله النيماتودا الخنجرية من نوع

X.diversicaudatum وفيروس التبقع الحلقى فى الطماطم (TRSV) ، وتنقله النيماتودا الخنجرية من **X.americanum** وغير ذلك من فيروسات أخرى.

٢ - مجموعة فيروسات القرقعة أو الخشخشة Rattle viruses (TRV):

أيضاً فيروسات التوبرا (عصوية)، وتنتقل سلالات هذه المجموعة بالنيماتودا القاصفة من نوع *Trichodorus pachydermus* وكذلك أنواع *T.primiticus, T. viruliferus &* *T.christie* وهى فيروسات عديدة العوائل، وتنتشر فى كثير من النباتات والأبصال والدرنات.

ويوجد جنس ثالث من النيماتودا وهو *Longidorus* ، وله علاقة بنقل بعض الأمراض الفيروسية الكروية الشكل، ففيروس الحلقة السوداء فى الطماطم (TBRV)والتبقع الحلقى فى توت الأرض تنقله النيماتودا *L.elongatus* ، ويقع الجنسان Xiphinems and Longidorus فى العائلة Dorylaimidae ، أما الجنس Trichodrus فيقع فى العائلة Tylenchidae.

جدول (٨-٢) : فيروسات النبات التى تنتقل بواسطة النيماتودا.

الفيروس	الناقل
أولاً: الفيروسات المتساوية الأبعاد (كروية):	**Nepoviruses**
فيروس التبقع الحلقى فى الطماطم (Tomato ringspot virus)	*Xiphinema americanum*
فيروس التبقع الحلقى فى الدخان (Tobacco ringspot virus)	*X. americanum*
فيروس موزيك الأرابس (Arabis mosaic virus)	*X. coxi and X.diversicaudatum*
فيروس التفاف أوراق الكريز (Cherry Leaf roll virus)	*X. coxi and X. diversicaudatum*
فيروس التبقع الحلقى فى القرنفل (Carnation ring spot Virus)	*X. diversicaudatum*
فيروس موزايك البروم (Brome mosaic virus)	*X. diversicaudatum*
فيروس الورقة المروحية فى العنب (Grape vine fanleaf yirus)	*X. index and X. italia*
فيروس الحلقة السوداء فى الطماطم (Tomato black ring virus)	*Longidarus attenuatus and L. elangatus*
فيروس التبقع الحلقى فى توت الأرض «الشليك» (Raspberry ringspot virus)	*L.elongatus and L.macrosoma*
ثانياً: فيروسات التوبرا (عصوية):	**Tobraviruses**
	Trichodarus spp (as) T. christiei
فيروس خشخشة الدخان	*T. teres, T. nanus, T. pachydermus*
(Tobacco rattle virus)	*T. anemones, T. teres, T. viruliferus*
فيروس التلون البنى المبكر فى البسلة (Pea early browning virus)	*T. pachydermus, T.teres, T.anemones, T.virnliferus.*

خواص النيماتودا الناقلة للفيروسات:

أ - **طريقة التغذية**: إن الثلاثة أجناس من النيماتودا المعروفة بنقلها للأمراض الفيروسية لها رمح طويل، إلاأن النيماتودا التى لم يثبت حتى الآن أنها لا تنقل أمراضًا فيروسية لها مثل هذه الخاصية، كذلك اقترح أن الغدة اللعابية الظهرية فى النيماتودا الناقلة تفتح بالقرب من اتصال البلعوم بالأمعاء، أما فى النيماتودا الناقلة مثل أجناس العائلة Tylen-chidae فإن الغدة اللعابية تنفتح فى تجويف البلعوم. ومن غير المؤكد حتى الآن إذا ما كان هذا الاختلاف له أى دخل فى قابلية النيماتودا فى نقل الفيروس أم لا.

ب - **انتقال الفيروس**: ليس من المعروف حتى الآن المدة اللازمة للنيماتودا للتغذية على العائل المصاب حتى يمكنه أن يكتسب الفيروس وينقله، إلا أنه وجد أنه يكفى تغذية ليوم واحد على العائل المصاب و٣ أيام على النبات السليم؛ حتى يمكن لفيروس Arabis mosaic أن ينتقل بواسطة النيماتودا الناقلة له وهما *Xiphinema diversi-caudatum* أو *X.paraelongatum*، وكذلك وجد أنه يكفى يوم واحد تغذية على النبات السليم لكى يصاب بفيروس Grapavine fan leaf، والذى ينقل بواسطة X.index كما وجد أن إضافة معلق فيروس Tomato black ring للتربة المنزرع بها نباتات طماطم سليمة، وبها النيماتودا الناقلة *Longidorus attenuatus* فإنه لاتحدث إصابة بالفيروس، إلا أن الإصابة تحدث عندما تزرع نباتات مصابة فى الوعاء نفسه الذى به النباتات السليمة. وبالعكس يمكن لفيروس Tobacco necrosis أن يصيب النباتات بإضافة معلق من الفيروس إلى التربة. ولا يعرف حتى الآن إذا كانت للفيروس مدة حضانة فى النيماتودا الناقلة أم أنهاتنقله مباشرة.

جـ- **مدة بقاء الفيروس فى النيماتودا**: تختلف مدة بقاء أو حمل النيماتودا للفيروس من فيروس لآخر، وهذه تتراوح ما بين١-٨ شهور، وهى مدة طويلة تبقى النيماتودا قادرة على إصابة النباتات دون أن تتغذى خلال هذه الفترة على نبات مصابة. وقد وجد أن فيروس Tobacco rattle يمكنه أن يبقى فى *T.pachydermus* حتى بعد تجويعها لمدة ٣٦ يومًا. كما أن فيروس Grapevine fan leaf يمكنه أن يبقى داخل النيماتودا

X.index مدة ٤ شهور، دون أن تتغذى على العائل المصاب.

د - **الاحتفاظ بالفيروس بعد الانسلاخ**: ليس من المعروف حتى الآن هل تحتفظ جميع النيماتودا بالفيروس بعد الانسلاخ كما يحدث مع المن الناقل للفيروسات الباقية أم لا. إلا أنه وجد أن بعض النيماتودا تفقد الفيروس بعد الانسلاخ، وقد يرجع ذلك إلى أن الطبقة الخارجية من الرمح تنسلخ أثناء تلك العملية.

هـ - **أطوار النيماتودا الناقلة للفيروس**: تعتمد هذه الخاصية غالبًا على الفيروس نفسه، فنجد أن يرقات *L.elongatus* يمكنها أن تنقل فيروس الحلقة السوداء **Tomato black ring**، ولا يمكن للطور البالغ أن ينقله، وبالعكس فإن النيماتودا نفسها يمكنها أن تنقل فيروس **Raspberry ring spot virus** بواسطة كل من اليرقة والطور البالغ.

و - **انتقال الفيروس إلى بيض النيماتودا**: لا يوجد ما يدل على أن الفيروسات تنتقل من جيل إلى جيل فى النيماتودا النافذة للأمراض الفيروسية.

ز - **الكشف عن الفيروس فى النيماتودا**: يمكن الكشف عن الفيروس فى النيماتودا، وذلك بطحن أفراد من النيماتودا الحاملة للفيروس فى نقطة ماء، ثم تلقيح نباتات اختيار بالمعلق؛ حيث إن الفيروسات التى بالنيماتودا تنتقل جميعها بالتلقيح الميكانيكى.

حـ - **تخصص النيماتودا فى نقل الفيروسات**: وجد أن هناك تخصصًا كبيرًا بين الأنواع المختلفة من النيماتودا فى نقلها للأمراض الفيروسية؛ فالإصابة بفيروسات **Tomato black ring & Raspberry ringspot** تكون دائمًا فى وجود أنواع ***Longidorus spp.***، بينما فى حالات فيروسات **Tobacco ring spot & Arabis mosaic** توجد فى ***Xiphinema spp.***.

٢- الانتقال بواسطة وبمساعدة الفطريات:

Transmission of plant viruses by Fungi

اكتشفت الفطريات كناقلات لفيروسات النبات لأول مرة عام ١٩٥٨، حيث سجل

جروجان وزملاؤه Grogan et al, 1958 علاقة مرض انتفاخ العروق فى الخس Lettuce big-vein disease بالفطر *Olpidium brassicae* وبعد ذلك سجل تيكل (١٩٦٠) Teakle علاقة فيروس نيكروزيس الدخان Tobacco necrosis بالفطر نفسه. وقد سجل أيضًا فى السنة نفسها (١٩٦٠) Hidaka علاقة فيروس تقزم الدخان Tobacco stunt بالفطر السابق ذكره.

وخلال الخمسة عشر سنة التى تلت ذلك الاكتشاف، زاد عدد الفيروسات إلى تسعة (٩)، وارتفع عدد الفطريات التى تقوم بنقلها إلى ستة (٦) فطريات (كما هو موضح فى الجدول (٨ – ٣)).

وتختلف الفيروسات التى تنتقل بواسطة الفطريات فيما بينها فى الشكل والحجم، مثل:

١ – الفيروسات المكورة (Polyhedral) (مثل):

Cucumber necrosis virus, Tobacco necrosis virus,

Tobacco stunt virus, Satellite virus.

٢ – الفيروسات العصوية مثل:

Potato virus X, Wheat mosaic virus

ويلاحظ أن هناك بعض الفيروسات، التى تنتقل بالفطريات غير معروفة الشكل حتى الأن مثل:

Lettuce big vein virus, pea false roll virus.

ويمكن نقل بعض هذه الفيروسات بالتلقيح الميكانيكى (بالعصارة) بسهولة، مثل: فيروس X البطاطس وفيروس نيكروزيس الخيار والدخان. أما بالنسبة لفيروس موزايك القمح وفيروس تقزم الدخان فتنتقل بصعوبة بالتلقيح الميكانيكى. أما فيروس انتفاخ العروق فى الخس، فإنه لا ينتقل بالتلقيح الميكانيكى.

جدول (٨ – ٣) : بعض خواص الفيروسات المنقولة بواسطة الفطريات والفطريات الناقلة.

اسم الفيروس	الحجم نانومتر	النقل الميكانيكى	درجة الحرارة المثبطة (م)	القدرة على التعمير	الفطر الناقل
نيكروزيس الدخان (TNV)	٢٦–٣٠	سهل	٨٠–٩٥	عدة أسابيع	Olpidium brassicae
الفيروس المصاحب SATALLITE	١٧	سهل	٩٠–٩٥	عدة سنوات	Olpidium brassicae
تضخم العرق فى الخس LBVV	–	غير معروف	–	–	Olpidium brassicae
تقزم الدخان TSV	–	بصعوبة	٧٥–٨٠	–	Olpidium brassicae
نيكروزيس الخيار CNV	٣١	سهل	٧٥–٨٠	أسابيع	Olpidium cucurbitacearaum
فيروس X البطاطس PVX	٥١٥X١٣	سهل	٧٠	أسابيع	Synchytrium endobioticum'
فيروس موس توب البطاطس PMTV	–	بصعوبة	٥٥ –٦٠	–	Spongospora subterranea
التفاف أوراق البسلة PeLRV	–	بصعوبة	٧٥–٨٠	أيام قليلة	Pythium ultimum
موزايك القمح WhMV	١٦٠X٢٠	بصعوبة	٥٥ –٦٠	–	Polymyxa graminis

وهناك بعض الفيروسات التى يعتقد انها تنتقل عن طريق التربة وبمساعدة فطريات أيضاً، وهى فى ٣ مجموعات [كامبل (١٩٨٠)]

أ – المجموعة الأولى	عصوى (١٩٠–٢٤٠)	نانومتر
ب – المجموعة الثانية	عصوى (١٥٠–٢٥٠)	نانومتر
جـ – المجموعة الثالثة	عصوى (١٥٠، ٣٠٥، ٣٣٠)	نانومتر

العلاقات بين الفيروسات والفطريات الناقلة لها :

تنتمى الفطريات التى تنقل الفيروسات السابق ذكرها إلى ٣ ثلاثة صفوف Classes هى:

1. Chytridiomycetes; *Olpidium brassicae, O. cucurbitacearum, Synchytrium endobioticum.*
2. Plasmodiophoromycetes: *Polymyxa graminis, Spongospora subterranea.*
3. Oomycetes: *Pythium ultimum.*

وتمر جميع هذه الفطريات أثناء نموها فى ثلاث مراحل؛ حيث إنها تنتج جراثيم هدبية، سواء كان ذلك عن طريق التكاثر الجنسى أو اللا جنسى zoospores. ولهذه الجراثيم المتحركة القدرة على نقل الفيروسات. وهذه الفطريات عادة طفيليات إجبارية، تصيب الجذور – ومن الفطريات الدنيئة غير المتطورة الممرضة سواء (تمتلك القدرة المرضية) أو طفيليات بسيطة؛ فهى تنتج جراثيم هدبية ذات سوط أو سوطين عادة. وهذه الجراثيم تتحوصل، وتصيب خلايا العائل.

خواص الناقلات الفطرية :

يمكن تلخيص بعض الملاحظات العامة على طبيعة العلاقة بين الفطرالناقل والفيروس فيما يلى:

١ – توجد درجة عالية من التخصص مع الأنواع الأخرى من الناقلات، فالفيروس الذى ينتقل بواسطة الفطر، لا يمكن أن ينتقل بأى نوع أو نموذج آخر من الناقلات؛ والفيروس الواحد ينتقل بواسطة نوع واحد من الفطر الناقل.

٢ – هذه الفيروسات تصيب وتتضاعف فى العائل، ولا يحدث ذلك تقريباً فى الفطر.

٣ – إن الفيروس والجراثيم الهدبية للفطر zoospore ينطلق كل منها مستقلاً عن الآخر من جذور العائل المصاب.

٤ – وجد من تجارب الاكتساب Acquisition فى المعمل أن الفيروس قد يوجد داخل الجراثيم الهدبية، أو يرتبط ارتباطًا وثيقًا بهما، ولا يوجد الفيروس فى هيفات الفطر الناقل، وقد أظهرت الدراسة باستخدام الميكروسكوب الإليكترونى على الجراثيم الهدبية حيث يلتصق بها الفيروس جزئيًا كما فى الفيروسTNV، وبلا شك فالخطوات الأخرى فى عملية النقل تتضمن حركة الفيروس خلال برتوبلاست الجراثيم الهدبية أثناء أو بعد تحوصلها، ثم تتحرر بعد إصابة بروتوبلاست الجراثيم الهدبية لخلية العائل.

كما وجد أن فطر **Olpidium spp.** يساعد فى نقل فيروسين هما Big-vein of lettuce وTobacco necrosis وغيرهما، وهذا الفطر من مجموعة الفطريات الأولية، وهى تكون داخل خلايا جذور العائل – وخصوصًا القريبة من القشرة – أكياسًا جرثومية Zoosporangia، وهذه يخرج منها إلى التربة جراثيم zoospores عن طريق أنابيب، تصل إلى خارج انسجة العائل. ثم تقوم هذه الجراثيم ذات الهدب الواحد فى الماء المحيط بالجذور، ثم تصيب خلية جذرية بعد سحب الهدب، ثم تكون كيسًا جرثوميًا داخل الخلية. ومن غير المعروف حتى الآن إذا كان هذا الفطر يساعد على دخول الفيروس عن طريق الجرح الذى يحدثه، أم أنه يحمل الفيروس بداخله. ولكن هناك نتائج تجربة قد تلقى ضوءاً على هذا السؤال، بأن إضافة مصل مضاد لفيروس نيكرزيس الدخان Tobacco necrosis إلى معلق هذا الفيروس خمسة دقائق، قبل إضافة معلق الجراثيم إلى خليط الفيروس والمصل المضاد له.. لا تحدث أى إصابة للنباتات. وبالعكس.. فإن إضافة المصل بعد خمس دقائق من إضافة الجراثيم إلى معلق الفيروس، فإن الإصابة تحدث مما يجعل احتمال نفاذ الفيروس إلى داخل الجرثومة أمراً محتملاً جداً، بناء على رأى Teakle and Gold سنة ١٩٦٣.

٣ – الانتقال عن طريق التربة بواسطة طرق غير معروفة:

وهذه تنقسم إلى قسمين:

أ – مجموعة الفيروسات التى يعتقد أن هناك كائنات دقيقة (كالفطريات) فى التربة تساعد على اصابة النباتات بالفيروس، مثل فيروسات تبرقش القمح الأصفر والتخطيط الأصفر للقصب Sugar cane chlorotic streak، وكذلك الموزايك الأصفر للشعير Barley

.yellow mosaic

ب – مجموعةالفيروسات التى يعتقد أنه لا لزوم لوجود ما يساعد على الإصابة بالفيروس مثل فيروس تبرقش الدخان، وعلى العموم فإنه يعتقد أن هذا الفيروس لا يحدث الإصابة للجذور، بل تحدث الإصابة خلال جروح على الساق، وتصلها العدوى من مياه الرى المحملة بالفيروس الموجود بالتربة.

الفيروس والتربة: Virus Ecology

أ – مدة بقاء الفيروس فى التربة:

تعتمد مدة بقاء الفيروس فى التربة على علاقة الفيروس، وكذا الكائن الذى نقله (فى حالة وجود كائن ينقل الفيروس)، وذلك بالعوائل المنزرعة، وكذلك علاقة الفيروس بالكائن الناقل له. وعلى العموم يمكن القول أن **معظم الفيروسات التى تنتقل عن طريق التربة تبقى مدة طويلة فى التربة الموجودة بها للأسباب التالية:**

١ – معظم الفيروسات التى تنتقل بواسطة النيماتودا، وكذا النيماتودا الذى ينقلها لها عوائل كثيرة، ومن ضمنها الحشائش؛ مما يعطى للفيروس وكذا النيماتودا الفرصة للبقاء فى التربة مدة طويلة جداً.

٢ – يمكن للنيماتودا أن تبقى مدة طويلة فى التربة غير المزروعة، وقد أمكن حفظ النيماتودا مدة عامين فى تربة رطبة داخل كيس بلاستيك.

٣ – يبقى الفيروس مدة طويلة داخل النيماتودا، وقد وجد أن فيروس Grapevine fan leaf يبقى على الأقل ٤ شهور داخل *X. index*.

٤ – ومما يساعد على بقاء التربة حاملة للفيروس مدداً طويلة، هو انتقال بعض الفيروسات عن طريق البذور وبقاء هذه البذور وإنباتها فى التربة نفسها، ووجود مصدر للفيروس فى التربة، كذلك فإن بعض جذورالنباتات الخشبية تبقى حية مدداً طويلة، قد تصل إلى سنتين فى حالة العنب، وذلك بعد تقليع النباتات.

٥ – يمكن للنيماتودا مواجهة الظروف الطبيعية القاسية مثل الجفاف أو البرودة التى تحدث

غالبًا فى الطبقات السطحية للتربة بأن تهاجر إلى الطبقات السفلية حيث تعيش، ثم ترجع ثانية إلى الطبقات السطحية عند انتهاء الظروف غير المواتية.

أما فى حالة الفطر *Olpidium* . . فإن طور الراحة Resting sporangia تكون غالبًا حاملة لفيروس Big-vein of lettuce، وهذا الطور يمكنه أن يبقى فى حالة حية عدة سنوات، وبذلك فإن الفيروس يمكنه أن يصيب الخس بعد عدة سنوات عن طريق هذا الفطر.

ب - توزيع وانتشار الأمراض الفيروسية فى الحقل:

عند دخول أحد الفيروسات التى تنتقل بواسطة التربة إلى الحقل لأول مرة (إما عن طريق البذور أو الدرنات الحاملة للفيروس أو مع الشتلات) فإن توزيع الفيروس وانتشاره يكون غالبًا محدداً فى مناطق متفرقة صغيرة، ثم ينتشر توزيعه على مدى السنين. **وهناك عدة عوامل تؤثر على توزيع انتشار تلك الفيروسات:**

١ - بعض الأمراض الفيروسية التى تنتقل بواسطة فطر مثل Big-vein of lettuce أو الفيروسات، التى يحتمل أن تنتقل بواسطة كائنات دقيقة مثل فيروس تبرقش القمح أو فيروس التخطيط الأصفر فى القصب، فإن هذه الفيروسات تنتشر بسرعة جداً فى الحقول ذات التربة الثقيلة، والتى بها نسبة عالية من الرطوبة، ويرجع ذلك غالبًا إلى زيادة نشاط الفطريات الناقلة للفيروس. أما بالنسبة للفيروسات التى تنتقل بواسطة النيماتودا، فإنها تنتشر غالبًا فى الأراضى الخفيفة؛ حيث تنشط وتتكاثر معظم النيماتودا بسرعة فائقة.

٢ - توزيع النيماتودا فى الأعماق المختلفة للتربة، وهذا العامل يؤثر خصوصًا عند مقاومة النيماتودا بتبخير التربة، فمن المعروف أن أكبر عدد للنيماتودا لا يكون فى الـ ١٠ سم السطحية للتربة، بل يكون غالبًا على عمق ١٥-٢٠ سم من سطح التربة، وتختلف أعداد النيماتودا فى الأعماق المختلفة، ولكن غالبًا تتواجد بعض الأفراد على عمق ١٠٠ سم، وقد تتواجد على عمق ٣٠٠ سم مع *X.index* .

٣ - انتقال بعض التربة من مكان لآخر أثناء العمليات الزراعية أو بالريح، وكذا تحرك الماء

الأرضى يساعد على انتشار الكائنات الناقلة للفيروس، والفيروس من مكان لآخر فى الحقل. كذلك يساعد استخدام أدوات زراعية عليها تربة ملوثة بالكائنات الحاملة للفيروس فى أرض نظيفة منها على انتشار تلك الفيروسات.

٤ - موافقة الظروف الطبيعية للتربة على تكاثر الكائنات الحاملة أو الناقلة للفيروس، التى تلوث التربة لأول مرة قد تجعل الإصابة تنتشر بشكل وبائى خلال عدة سنوات.

٥ - بعض النيماتودا الناقلة للفيروسات مثل *T.teres & T.christiei* تتوالد بكرياً Parthenogenetically، ولكن بعض الأنواع يلزمها تواجد ذكور وإناث للتكاثر، ولذلك فإن الأنواع التى تتوالد بكريا تزداد فى العدد بسرعة، وبالتالى تظهر الإصابة بالفيروسات، وتنتشر بسرعة خلال عدة سنوات فى الحقول النظيفة، عند إدخال بعض أفراد من هذه الأنواع وتلويث التربة بها لأول مرة.

٦- الانتقال بواسطة الحشرات : Transmission by insects

تعتمد معظم الفيروسات على نشاط الحشرات فى انتقالها، وأنه من الأهمية الكبرى للانتشار السريع لأى فيروس، أن تكون الظروف الجوية ملائمة للتكاثر السريع للحشرة الناقلة وملائمة كذلك لحركتها. وهناك عامل مهم للانتشار السريع للفيروسات النباتية، وهو الظروف البيئية التى ينمو تحتها النبات، حيث إن الظروف البيئية الملائمة تساعد على نمو النبات السريع، وبالتالى فإن النباتات السريعة النمو تكون لها قابلية عالية للإصابة.

وقليل من الفيروسات لا ينتقل بواسطة الحشرات مثل فيروس تبرقش الدخان وفيروس X البطاطس، وفيروس تقزم الخلفة فى القصب، فهى لا تنتقل إلا بواسطة العصارة. كذلك نجد أن معظم فيروسات الموالح لا ينتقل إلا عن طريق التطعيم، ولا ينتقل بواسطة الحشرات مثل فيروس القوباء Psorosis وفيروس تلون قلف اليوسفى Cachexia، وفيروس تنقر خشب الليمون الحلو، أما معظم الفيروسات فهى تعتمد على الحشرات لنقلها ونشرها.

والحشرات التى تنقل الأمراض الفيروسية تكون فى الغالب من ذات أجزاء الفم الثاقب الماص؛ حتى يمكنها أن تمتص عصارة النباتات، التى تحتوى على الفيروس، ثم تنقلها ثانية

إلى النباتات السليمة أثناء تغذيتها عليها. ولو أنه من غير المعروف بالضبط ماذا يحدث للفيروس داخل الحشرة، إلا أنه يعتقد أن الحشرات لاتنقل بعض الفيروس على أجزاء فمها، أو بمعنى آخر أن الفيروس يجب أن يدخل الحشرة ثم يفرز مع اللعاب ثانية.

وهناك قليل جداً من الفيروسات يمكنها أن تنتقل بواسطة حشرات ذات فم قارض، وذلك لتلوث أجزاء الفم بالفيروس أثناء تغذيتها على العائل المصاب، ثم انتقاله إلى العائل السليم، ويعتقد أن معظم الأمراض الفيروسية التى تنتقل عن طريق العصارة لا تنتقل على أجزاء فم الحشرات القارضة، وذلك يرجع غالبًا إلى أن تلك الحشرات تسبب موت الخلايا على حواف الأوراق التى تتغذى عليها الحشرات؛ مما يجعل الفيروسات لا تتمكن من الدخول إلى الأنسجة الداخلية، فنجد مثلاً أن فيروس تبرقش الدخان – وهو من الفيروسات التى يمكنها أن تتحمل الظروف بدرجة عالية – لا يمكنه أن ينتقل بواسطة هذا النوع من الحشرات، ومن الفيروسات التى تنتقل بواسطة تلك الحشرات، هو فيروس التبرقش الأصفر للفت Turnip yellow mosaie Virus، وكذلك فيرويد الدرنات المغزلية فى البطاطس Potato spindle tuber viroid، التى تنتقل بواسطة بعض خنافس الورق وبعض الجراد، وهذان الفيروسان مختلفان فى طرق انتقالهما، فنجد أن الأول لا ينتقل بواسطة الحشرات ذات الفم الثاقب الماص، أما الثانى فيمكن أن ينتقل بواسطة المن، بجانب انتقاله بواسطة الحشرات ذات الفم القارض. ومن المعروف حاليًا حوالى ٤٠٠ نوع من الحشرات تقوم بنقل أكثرمن ٢٠٠ نوع من الفيروسات المعروفة. وتعتبرحشرة المن من أهم هذه الحشرات.

والحشرات ذات اجزاء الفم الماص، والتى تنقل فيروسات النبات، هى:

١ - المن **Aphididae**: ويعتبر المن أكبر مجموعة من الحشرات، التى تنقل الفيروسات سواء من جهة عدد الفيروسات التى تنقلها، أو من جهة عدد أنواع المن الناقلة، فهذه المجموعة تنقل حوالى ١٠٠ فيروس من الفيروسات النباتية المعروفة حتى الآن. وتنقل حشرة المن ***Myzus persicae*** أكثر من ٧٠ فيروسًا، ومعظم الفيروسات التى تنتقل بواسطة المن تسبب أعراض موزايك، إلا أن بعض الفيروسات التى تنتقل بواسطة المن وتسبب اصفرارًا مثل اصفرار بنجر السكر **Sugar beet yellows** والتقزم الأصفر فى البصل

.Onion yellow dwarf

٢ - **نطاطات الأوراق Leaf hoppers** : تنقل عدداً من الفيروسات النباتية مثل فيروس تجعد قمة بنجر السكر، فيروس التورم الجرحى فى البرسيم، فيروس تقزم الأرز Rice stunt. وتعتبر نطاطات الأوراق من أهم الجاميع الحشرية بعد حشرات المن فى الأهمية فى نقل فيروسات النبات فى الطبيعة، وتسبب عادة leafhopper، ونطاطات الأوراق أمراض التفاف الأوراق والإصفرار، وأن القليل من هذه الفيروسات فقط ينتقل ميكانيكياً.

٣ - **بق النبات Miridae** : وهى من الحشرات التى لم يثبت أنها تنقل الفيروسات بنشاط، ويوجد نوع ثبت نشاطه فى نقل فيروس Beet savoy، وهو *Piesma cinereum*.

٤ - **الذبابة البيضاء Aleurodidae** : ويوجد ١٤ نوعاً من الذباب الأبيض، الذى ينقل أكثر من ٢٠ فيروساً، مثل: فيروس تجعد ورق القطن فى السودان Cotton leaf curl، وفيروس تجعد ورق الدخان، وفيروس تجعد الأوراق الأصفر فى الطماطم.

٥ - **الحشرات القشرية والبق الدقيقى Coccoidae** : ومن المعروف حتى الآن أن البق الدقيقى mealy bugs هو الذى يقوم بنقل الأمراض الفيروسية من هذه المجموعة من الحشرات؛ فهى تنقل الساق المتضخم فى الكاكاو Cocoa Swollen shoot بواسطة الحشرة *Planocides njalensis*.

٦ - **التربس Thysanoptera** : وهو ينقل فيروساً واحداً وهو فيروس الذبول المبقع فى الطماطم.

٧ - **الحشرات ذات الفم القارض Orthoptera** : والتى تنقل بعض حشرات هذه المجموعة CMV، كما أن بعض أنواع جراد الحشائش Grass hoppers ينقل فيروس التبرقش الأصفر للفت Turnip yellow mosaic، وكذا فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس Potato spindle tuber، وفيروس X فى البطاطس.

٨ - الخنافس **Coleoptera**: وهى تنقل بعض الفيروسات، مثل: فيروس موزايك اللوبيا وموزايك الفاصوليا وموزايك الكوسة وموزايك الفجل، وتلون بذور الفول.

أهمية حشرات الذباب الأبيض فى نقل فيروسات النبات:

توجد الأمراض التى تنقلها حشرات الذباب الأبيض أساسًا فى البلدان الاستوائية وشبه الاستوائية وأيضًا فى البلدان المعتدلة. وأصبحت الأمراض التى ينقلها الذباب الأبيض ذات أهمية على محاصيل البقوليات والطماطم والقطن والشطة فى مناطق مختلفة من العالم.

وهناك ثلاثة أنواع من الذباب الأبيض، وهى:

Bemisia tabaci, Trialeurodes vaporariorum and T.abutilonia. معروفة بنقلها للفيروسات النباتية. ولقد وضع كوستا (١٩٧٦) Costa **الأمراض التى تنقلها حشرات الذباب الأبيض فى مجموعات، هى:**

أ - الموزايك.

ب - تجعد الأوراق.

جـ - أنواع الاصفرار.

وتسبب الأمراض الفيروسية التى تنقلها الذباب الأبيض خسارة جسيمة لكثير من المحاصيل حيث تتراوح الخسارة من ١٠-٩٥٪، كما فى الهند، عندما يوجد فيروس تجعد أوراق الطماطم. ينتقل الفيروس بالتطعيم والذبابة البيضاء *B.tabaci* ويشتمل المدى العائلى له عوائل كبيرة، منها: الدخان - البطاطس - الداتورا - الدخان البرى - الباميا. وبعض هذه الفيروسات أمكن نقلها أيضًا ميكانيكيًا.

يعتبر الذباب الأبيض من الناقلات المهمة جداً للفيروسات التى تسبب أمراضًا مهمة على المحاصيل الاقتصادية، التى تزرع فى المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية مثل البقوليات والقطن والكسافا والدخان والطماطم؛ حيث تنقل فيروسات مرض تجعد أوراق الدخان To-bacco leaf curl، وغيره من الأمراض المذكورة فى الجدول (٨ - ٤). وتدل التجارب التى

أجراها ڤارما Varma بأن الحشرة الواحدة من *B.tabaci* قد تحمل وتنقل فيروسين مختلفين عن بعضهما فى آن واحد. ويعتقد بأن هذه الحشرات غالبًا ما تحتفظ بقدرتها على نقل الفيروسات طوال فترة حياتها. وقد تكون الإناث أكثر كفاءة بكثير من الذكور فى نقل الفيروسات. كل من الحشرات والحوريات تتمكن من أخذ الفيروسات من النبات المصاب، ونقلها إلى النبات السليم. وتدل المعلومات المتوفرة عن مسببات الأمراض، التى تنتقل بواسطة الذباب الأبيض أن هذه الحشرات تحتاج إلى فترة تغذية بين ٥٠-٢٤٠ دقيقة لأخذ المسببات من النبات المصاب، وتحتاج إلى فترة كامنة تتراوح بين ٤-٨ ساعات لتصبح قادرة على نقل الفيروس. كما تحتاج لفترة تغذية ١٠-١٢٠ دقيقة لنقل المسبب المرضى. ومن ذلك يستدل بأن طبيعة العلاقة بين الذباب الأبيض والفيروسات التى تقوم بنقلها، هى أقرب ما تكون إلى الفيروسات التى تمر من قناة الهضم إلى الدمcirculative virus، أو الفيروسات الباقية Persistent بالنسبة للفيروسات التى تنقل بواسطة المن والقفازات .

جدول (٨ - ٤) : فيروسات النبات التى تنتقل بواسطة الذباب الأبيض.

الفيروس	الناقل
أولاً : أمراض الموزايك الأصفر :	**Yellow mosaic diseases**
١- الموزايك الأصفر فى الاكاليفا (Acalypha indica)	*Bemisia tabaci*
٢- الموزايك الأصفر فى الخطمية (Althaca rosea)	*B. tabaci*
٣- الموزايك الاصفرفى الجوت (Corchorus triloculars)	*R. tabaci*
٤- الموزايك الأصفر فى اللبلاب (Dolichos lablab)	*B. tabaci*
٥- الموزايك الأصفر فى الأوفوربيا	*B. tabaci race sidae*
٦- الموزايك الأصفر فى الورد	*B. tabaci*
٧- الموزايك الأصفر فى الفاصوليا	*B. tabaci*
٨- الموزايك الأصفر فى اللوبيا	*B. tabaci*
٩- الموزايك الأصفر فى الطماطم	*B. tabaci*
ثانياً : أمراض موزايك العرق الأصفر :	**Yellow vein mosaic virus**
١- موزايك العرق الأصفر فى القرع	*Bemisia tabaci*
٢- الاصفرار الشبكى فى الدخان	*B. tabaci*
٣- الاصفرار الشبكى فى الزينيا	*B. tabaci*
٤- اصفرار العرق الشبكى فى نبات التوت (Mulberry)	*Bemisia spp.:*
ثالثاً : أمراض تجعد الأوراق :	**Leuf curl**
١- تجعد أوراق الشطة (Chilli)	*B. tabaci*
٢- تجعد أوراق الباباظ (Papaya)	*B. tabaci*
٣- تجعد أوراق القطن	*B. gossypiperda*
٤- تجعد أوراق التيل	*B. tabaci*
٥- تجعد أوراق الطماطم	*B. tabaci*
٦- تجعد أوراق الدخان.	*B. tuberculatai, Trialeurodes natalensis* *Aleuvotrachelus socialis*
٧- تجعد أوراق البطاطس	*B. tuborculata, A. socialls*
٨- تجعد أوراق الجورانيم	*B. tabaci*

أهمية حشرات الخنافس فى نقل الفيروسات :

Transmission of viruses through beetles

تنتقل أغلب الفيروسات النباتية بواسطة الحشرات ذات الفم الثاقب الماص، ولكن ينتقل القليل عن طريق الحشرات ذات الفم القارض.

وحديثًا سجل Cockbain (١٩٧١) أن أربعة من السوس weavils تتضمن نوعين من Apion ، ونوعين من Sitona تعتبر النواقل الأساسية لفيروس تلون بذور الفولBroad bean stain virus (BBSV) ، وقد كانت أنواع Apion هى الأكثر كفاءة بدرجة كبيرة.

والجدول (٨ - ٥) : يبين بعض الفيروسات النباتية التى تنتقل بواسطة الخنافس.

الفيروس	الناقل
تلون بذور الفول (BBSV)	*Apion vorax, A. arthops.*
تلون بذور الفول (BBSV)	*Sitona lineatus, S. hispidulus.*
الموزايك الأصفر فى اللفت (TYMV)	*Phaedon ecochleriae.*
الدرنة المغزلية فى البطاطس (فايرويد)	*Liptinotarsa decemlineata.*
موزايك الفجل	*Phyllotrata spp.*
موزايك الباذنجان	*Epithrix fuscula.*
التبقع الحلقى فى الدخان	*Epithrix parvula, E. cucumeris*
موزايك الكوسة	*Diabrotica undecimpunctata*
موزايك الكوسة	*Acalyma vittatum*
موزايك اللوبيا	*Ceratonma trifurcata*
موزايك الفاصوليا	*Ceratonma trifurcata*

وقد وجد بأن نقل الفيروسات عن طريق الخنافس ليس إلا عملية ميكانيكية تحدث بالتصاق الفيروسات على فكوك الحشرات المذكورة، أثناء تغذيتها على النباتات المصابة، ثم تنقل إلى النباتات السليمة أثناء تغذية الحشرات على أنسجتها؛ فمثلاً وجد بأن الجراد

الكبير الحجم *Melanophus existientialis* يحمل فيروس موزايك الدخان(TMV) على فكوكه، بعد تغذيته على نباتات مصابة، وينقلها إلى النباتات السليمة التى يتغذى عليها، والتى تكون حساسة (قابلة للإصابة) بالفيروس المذكور.

غير أن التعميم بأن جميع الحشرات القارضة تنقل الفيروسات بصورة ميكانيكية بحتة قد لا ينطبق على جميع الفيروسات التى تنتقل بواسطة الحشرات القارضة.. إذ لابد من إضافة شرط عدم وجود غدد اللعاب (Salivary glands) فى الحشرات القارضة، التى تقوم بنقل الفيروس؛ حيث إنه قد وجد بأن للإفرازات اللعابية دوراً مهمًّا فى عملية نقل الفيروسات بواسطة الحشرات. وتعليل ذلك هو أن الحشرات التى لا تمتلك غدداً لعابية تتقيأ Regurgitate بعض محتويات الجزء الأعلى من القناة الهضمية Foregut، والتى تتضمن بعض أجزاء النبات المصاب، وتعيد مضغه لتسهيل عملية الهضم، وأثناء هذه العملية يحدث تلامس بعض القطع من أجزاء النبات المصاب فى فم الحشرة، وأنسجة أوراق النبات السليم الذى تتغذى عليها الحشرة، وتحدث العدوى. بينما الحشرات التى تمتلك غدد لعاب لا تقوم بتقيؤ ومضغ أنسجة النبات التى تم ابتلاعها، ولذلك لا تحدث الملامسة المباشرة بين الأنسجة المصابة (داخل فم الحشرة) والأنسجة السليمة للنبات، بالإضافة إلى وجود بعض المواد المثبطة Inhibitors فى الإفرازات اللعابية بالنسبة لبعض الفيروسات. ولذلك نرى أن فيروس موزايك اللفت الأصفر Turnip yellow mosaic virus لا ينتقل بواسطة Caterpil-lar، رغم كونها من الحشرات القارضة؛ لأنها تمتلك غدداً لعابية، وعليه فإنها لا تتقيأ غذاءها لتقوم بإعادة مضغه.

ومن المعروف بأن الخنافس أو يرقاتها التى تنقل الفيروسات لها قدرتها على إصابة النباتات لبضعة أيام، دون الحاجة إلى تغذيتها مرة أخرى على نباتات حاملة للفيروس، ويعتقد بأن هذه المدة هى فترة بقاء الأنسجة المصابة فى الجزء الأعلى من القناة الهضمية للحشرة، وأن بعد الانتهاء من هضم هذه الأنسجة، لابد من تغذية الحشرة على نبات مصاب لاستعادة قدرتها على نقل الفيروس.

علاقة الفيروس بالحشرة الناقلة له:

أهم علاقة بين الفيروس والحشرة هى علاقة المدة التى تلزم للحشرة للتغذية على العائل المصاب؛ حتى يمكنها أن تكون حاملة للفيروس، وقادرة على إحداث العدوى، وكذلك المدة التى تبقى فيها الحشرة قادرة على إحداث العدوى للعائل. فنجد أن بعض الحشرات يمكنها أن تلتقط الفيروس من العائل فى مدة تغذية قصيرة، ولكنها تتطلب مدة طويلة؛ حتى يمكنها أن تصبح قادرة على عدوى النباتات، وغالبًا تبقى لمدة طويلة حاملة للفيروس، وبالعكس نجد أن بعض الحشرات يمكنها أن تنقل الفيروس مباشرة بعد التغذية على العائل المصاب، وغالبًا تفقد القدرة على عدوى النباتات بعد عدة ساعات من مغادرتها العائل المصاب بالفيروس، وكذلك لا تنقل المرض إلا لنبات واحد، ثم تفقد القدرة لإحداث العدوى فى النباتات التالية.

وهذه العلاقة يحملها الفيروس نفسه وليس الحشرات، فنجد أن فيروسًا ما إما أن يكون من النوع الأول أو تلتقطه الحشرات فى مدة تغذية قصيرة، ويتطلب مدة طويلة داخل الحشرة بعد تغذيتها على العائل المصاب. وهذه الصفة تبقى ملازمة للفيروس حتى باختلاف أصناف الحشرات التى تنقله. وبالعكس نجد أن حشرة ما يمكنها أن تنقل فيروسين مختلفين أحدهما من النوع الأول، والآخر من النوع الثانى، وبذلك نجد أن الحشرة الناقلة ليس لها أى دخل فى هذا التقسيم.

وقد اعتقد أن النوع الأول من الفيروسات يجب أن يبقى داخل جسم الحشرة بعض الوقت، قبل أن تتمكن الحشرة من نقله لوجود علاقة بينه وبين الحشرة حتى تكاثره داخل الحشرة، كذلك اقترح أن النوع الثانى من الفيروسات ينتقل بطريقة ميكانيكية بحتة على أجزاء فم الحشرة؛ أى إنه لا يدخل جسم الحشرة.

وقد قام Watson & Roberts سنة ١٩٣٣ بتسمية المجموعة الأولى من الفيروسات بالفيروسات الباقية Persistant V.، أما المجموعة الثانية فقد أطلق عليها فيروسات غير باقية، وقد اعتمد فى هذه التسمية بأن قاما بتقسيم الفيروسات بالنسبة للمدة التى تبقى فيها الحشرة حاملة للفيروس، فإذا أصبحت الحشرة قادرة على نقل الفيروس لمدة طويلة، قد تصل

إلى طول حياتها فإنها تكون من المجموعة الأولى، أما إذا فقدت القدرة على نقل الفيروس بعد تغذيتها على العائل بمدة بسيطة تقدر بالساعات.. فإنها توضع فى المجموعة الثانية. وبذلك نجد أن هذا التقسيم اعتمد على مدة احتفاظ الفيروس فى حالة إمكان إحداث العدوى به، ولم يدخل فى الاعتبار مدة التغذية على العائل، أو المدة التى تمضى قبل أن تتمكن الحشرة من نقل الفيروس، وكذلك مدى إمكانها إحداث العدوى فى نباتات متتالية؛ حيث إن هذه الخواص يمكن تغييرها بتغيير طرق تغذية الحشرة على العوائل، فمثلاً نجد أن بعض الفيروسات التى كان متفقًا عليه من أنه من النوع غير الباقى (أى أن الحشرة التى تنقله يمكنها إحداث العدوى للعائل بعد مغادرة النبات المصاب مباشرة، ولا يمكنها أن تصيب إلا نباتًا واحداً فقط، ثم تفقد قدرتها على عدوى النبات التالى) يمكن زيادة عدد النباتات، التى يمكنها أن تصيبها بتقصير المدة التى تتغذى فيها الحشرة على العائل السليم، وبذلك يمكن للحشرة أن تحدث العدوى فى عدة نباتات.

وعلى هذا نجد أن تقسيم الفيروسات إلى فيروسات باقية وغير باقية يعتمد على الوقت، وقد ظهر من هذا التقسيم مجموعة من الفيروسات، التى يمكن أن تعتبر ما بين باقية وغير باقية؛ مما جعل Watson سنة ١٩٦٠ يعمد إلى تقسيم الفيروسات إلى قسمين: فيروسات خارجية؛ أى التى تنتقل ميكانيكيًا على أجزاء فم الحشرة وفيروسات داخلية، أى الفيروسات التى ندخل جسم الحشرة وتمر فيه إلى الغدد اللعابية، ومنها إلى النبات. ولكن قام **Kennedy et al** سنة ١٩٦٢ بتغيير هذين الاسمين إلى **Stylet-borne Viruses** أى الفيروسات التى تحمل على اجزاء الفم، وذلك بالنسبة للفيروسات الخارجية.

أما بالنسبة للفيروسات الداخلية فقد أطلق عليها **Circulative viruses** اى الفيروسات التى تمر داخل الحشرة، دون أن تتكاثر داخل الحشرة، أما إذا ثبت أنها تتكاثر داخل الحشرة فإنه يطلق عليها **Propagative viruses**، وعلى ذلك نجد أن التقسيم الجديد يعتمد اعتماداً كليًا على علاقة ثابتة بين الفيروس والحشرة، وليس على الوقت كما كان التقسيم القديم.

أولاً: الفيروسات التى تحمل على أجزاء الفم أو الفيروسات الخارجية:

تحمل بعض الفيروسات على اجزاء فم الحشرة من النبات المصاب إلى النبات السليم

وتصيبه ميكانيكيًا، كما يحدث بالتلقيح بالعصير، بدليل أن الوقت الذى يمر من وقت تغذية الحشرة على النبات المصاب ثم النبات السليم، قد يصل إلى ثوانٍ أو دقائق قليلة، ومع ذلك تحدث العدوى، ومثل هذا الوقت القصير يدل على انه لا توجد فترة كافية للفيروس لأن يدخل إلى داخل الحشرة ويمر فيها، ثم يمكن إفرازه مع اللعاب خلال هذه الفترة القصيرة، وعلى هذا الأساس أطلق على هذه المجموعة من الفيروسات « الفيروسات التى تحمل على أجزاء الفم الخارجية ».

وهذه الطريقة التى يحدث فيها تلقيح النبات ميكانيكيًا بواسطة أجزاء الفم الملوثة بالفيروس تثير كثيراً من علامات الاستفهام عن علاقة الفيروس بأجزاء فم الحشرة التى يمكنها فى بعض الأحوال أن تنقله، وفى البعض الآخر لا يمكنها، ويرد فى التالى بعض الاستفهامات :

١ – لماذا يوجد تخصص للفيروس بالنسبة للحشرة التى تنقله؛ أى إن بعض أنواع الحشرات من جنس معين يمكنها أن تنقل فيروساً ما، ومع ذلك لا تنقله أنواع أخرى من الحشرات من الجنس نفسه.

٢ – فى بعض الفيروسات نجد أنها تنتقل بواسطة عدة أنواع من المن، إلا أن بعضها له قدرة عالية فى إحداث العدوى عن البعض الآخر.

٣ – يمكن لحشرة ما أن تنقل بعض سلالات أحد الفيروسات، ولكن لا يمكنها أن تنقل السلالة الأخرى من هذا الفيروس، كما يحدث مع سلالات فيروس فى البطاطس؛ حيث إن بعضها ينتقل بواسطة حشرة المن *Myzus persicae*، والبعض الآخر لا ينتقل بواسطة تلك الحشرة.

٤ – إذاكانت الفيروسات تنتقل بواسطة الحشرات بطريقة ميكانيكية بحتة، فإنه كان يجب أن تنتقل فيروسات مثل فيروس تبرقش الدخان وفيروس X فى البطاطس بواسطة الحشرات. وهذا ما لا يحدث، مع أن هذين الفيروسين من الفيروسات السهلة الانتقال بواسطة التلقيح بالعصارة وبالطرق الميكانيكية الأخرى مثل تلامس الأوراق.

وعلى ذلك نجد أن مثل هذه الاستفهامات تزيد الموضوع تعقيداً مما يجعلنا - للإجابة عن مثل هذه الاستفهامات - نضع فى الحسبان العائل الذى ينتقل منه الفيروس، والعائل الذى ينتقل إليه، وما دخل العائل فى نجاح عملية الانتقال بواسطة الحشرات فمثلاً نجد أن فيروس تبرقش الدخان لا ينتقل من دخان إلى دخان بواسطة الحشرات، ولكن يمكنه أن ينتقل من طماطم إلى طماطم. كذلك يجب أن يوضع فى الحسبان الصفات المورفولوجية والتشريحية والفسيولوجية لأجزاء فم الحشرة وصفات اللعاب، وكيفية إفرازه أثناء عملية التغذية، أو بمعنى آخر العوامل التى لها علاقة مباشرة على نجاح التقاط الفيروس على أجزاء الفم من العائل المصاب، وإمكان نجاح العدوى بترك أجزاء الفم للفيروس فى أنسجة النبات السليم فى حالة نشطة وتوصيلها للبؤرة، التى يمكن أن يحدث عندها تكاثر الفيروس وحدوث العدوى.

وتتميز مجموعة الفيروسات التى تنتقل ميكانيكيًا على أجزاء فم الحشرة بالتالى:

١ - من الخواص المعروفة عن مجموعة الفيروسات التى تنتقل ميكانيكيًا على أجزاء فم الحشرة (واتسون سنة ١٩٣٨) أنه بتجويع الحشرة قبل التغذية على العائل المصاب مدة ساعة، يزيدمن قدرة الحشرة فى نقل الفيروس. وهذه النظرية القديمة قد ثبت أخيراً عدم صحتها فإنه لو تركت الحشرة لتتغذى بهدوء دون حدوث أى اضطرابات خارجية تجعل محاولة التغذية متقطعة، فإنه لايوجد فارق فى قدرة نقل الفيروس بواسطة الحشرة، سواء عرضت لفترة تجويع أم لم تعرض.

٢ - كلما نقصت مدة تغذية الحشرة على العائل المصاب، زادت قدرتهاعلى إحداث العدوى.

٣ - كلما نقصت فترة تغذية الحشرة الحاملة للفيرس على العائل، زاد عدد النباتات التى يمكن للحشرة أن تصيبها.

٤- معظم هذه الفيروسات تنتقل بالمن.

ثانياً: الفيروسات التى تمر داخل الحشرة أو الفيروسات الداخلية:

كما ذكر من قبل، تتميز معظم الفيروسات التى تنتقل بواسطة حشرة المن بأن الحشرة يمكنها أن تلتقط الفيروس، وتنقله فى خلال ثوانٍ أو دقائق قليلة من التغذية على العائل المصاب ثم السليم، ولكن الحشرة تفقد بسرعة قدرتها على نقل الفيروس بعد ذلك، إلا إذا تغذت ثانية على عائل مصاب، ويعنى ذلك أن الفيروس يحمل على أجزاء الفم. أما المجموعة الثانية وهى الفيروسات التى تمر داخل الحشرة أو الفيروسات الداخلية، فإنها تتميز بمرور فترة من الوقت تقدر بالساعات أو الأيام ما بين التغذية على العائل المصاب، وإمكان نقل الحشرة للفيرس، كما تتميز بأن الحشرة لا تبقى قادرة على نقل الفيروس عدة أيام أو مدة أطول بعد تركها للعائل المصاب بالفيروس.

ويطلق على هذه المجموعة من الفيروسات التى تمر داخل الحشرة - وإذا ثبت من دراسة أحد هذه الفيروسات ما يدل على أنها تتكاثر داخل الحشرة الناقلة لها - فإنه يطلق على هذا الفيروس أو الفيروسات التى تتكاثر داخل الحشرة Propagative viruses، وبذلك نجد أن تغيير تسمية الفيروسات وعلاقتها بالحشرة، تأخذ الآن طريقًا واضحًا على أساس علاقات ثابتة ما بين الفيروس والحشرة وليس على الزمن الذى تبقى فيه الحشرة حاملة للفيروس، كما كان يطلق عليها من قبل، وهى الفيروسات غير الباقية Non-persistent viruses فى الحشرة (الفيروسات الخارجية) والفيروسات الباقية فى الحشرة Persistent viruses (الفيروسات الداخلية).

أ - مرور وتكاثر الفيروسات داخل الحشرة:

من الأمثلة الواضحة لمرور أحد الفيروسات داخل الحشرة وعدم تكاثرها فيها، هو فيروس تجعد أوراق بنجر السكر Sugar beet curly top، الذى ينقله نطاط الورق *Circulifer tenellus*، فقد افترض Freitag سنة ١٩٣٦ أنه لو كان هذا الفيروس يتكاثر داخل الحشرة الناقلة له، فإن الحشرة يجب أن تحمل الفيروس طول حياتها، كما أن مدة تغذية الحشرة على النبات المصاب يجب ألا تتدخل فى عدد النباتات، التى يمكن أن تصاب، فعدد النباتات التى يحدث لها العدوى يجب أن يكون متساوياً، سواء تغذت الحشرة على العائل المصاب

لمدة بسيطة أم لمدة طويلة.

وقد دلت نتائج تجاربه على أن هذا الفيروس لا يتكاثر داخل الحشرة، فقد وجد أن هناك تناقصًا فى نسبة النباتات التى تصاب بالفيروس، وذلك عند نقل الحشرة الحاملة للفيروس يوميًا إلى نباتات سليمة لمدة ٣٠ يومًا. كذلك وجد أن بإطالة مدة تغذية الحشرة على المصدر المصاب.. فإن الحشرة تبقى مدة أطول حاملة للفيروس، كذلك وجد أن إبقاء الحشرة الحاملة للفيروس على نبات منيع للفيروس مثل الذرة السكرية، ثم اختبار الحشرة كل عشرة أيام بتغذيتها على نباتات بنجر، فإن نسبة النقل تتناقص، فبعد العشرة أيام الأولى تنقص نسبة نقل الفيروس إلى ٥٠٪، وبعد ١٩ يومًا تنقص نسبة الانتقال إلى ١ر٣٪.

وقد توصل Bennett and Wallace سنة ١٩٣٨ إلى النتيجة نفسها من أن هذا الفيروس لا يتكاثر داخل الحشرة، ولكن النتائج التى وجدها Maramorosch سنة ١٩٥٥ تلقى ضوءاً أن هناك احتمالاً بأن هذا الفيروس يتكاثر داخل الحشرة، فقد وجد أن بحقن افراد من حشرة *C.tenellus* بفيروس تجعد أوراق البنجر مخفف بدرجات مختلفة، فإن فترة الحضانة تكون أقصر فى التخفيفات العالية، وذلك فى فردين من خمسة أفراد، عنها من التخفيفات المنخفضة، وذلك فى فردين من ستة أفراد، ولو أنه وجد أنه عند نقل أفراد كلتا المجموعتين المحقونة بتخفيف عالٍ أو بتخفيف منخفض يوميًا إلى نباتات سليمة، فإن مجموعة الأفراد المحقونة بتخفيف منخفض تحدث عدوى بنسبة أعلى من تلك المحقونة بتخفيف عالٍ.

وقد اقترح Kunkel سنة ١٩٢٦ أن اصفرار الاستر Aster yellows يتكاثر داخل نطاط الورق *Macrosteles divisus* الناقل له، على أساس أن هذا المسبب له فترة حضانة داخل الحشرة، تقدر بحوالى ٩ أيام، كما أن الحشرة تبقى حاملة للمسبب طول عمرها. وقد قام بمحاولة إثبات احتمال حدوث تكاثر المسبب (ميكوبلازما) داخل الحشرة بأن قام بوضع أفراد من هذه الحشرة حاملة للمسبب على حرارة ٣٥ْم لمدة مختلفة، ثم إرجاعها ثانية إلى درجة ٢٤ْم، فوجد أن الأفراد لا تستطيع نقل المرض فوراً عند رجوعها إلى ٢٤ْم، بل تقضى فترة قبل إمكانها أن تصيب نباتات سليمة، أما إذا عرضت على درجات أعلى من ٣٥ْم، فإنها تفقد قدرتها على إحداث العدوى عند رجوعها إلى درجة ٢٥ْم. وهذه النتيجة تدل

على أن تعريض الأفراد لدرجة ٣٥ْم يجعل الحشرة تفقد جزءاً كبيراً من الميكوبلازما الذى بداخلها، بحيث لا يمكن أن تحدث العدوى، ولكن برجوع الحشرة إلى درجة ٢٤ْم، فإن المسبب يتكاثر داخل الحشرة ويمكن للحشرة أن تحدث العدوى، وتصبح حاملة للمسبب. أما بتعريض الحشرة لأكثر من ٣٥ْم فإن المسبب (الميكوبلازما) ينتهى تماماً من الحشرة.

ولقد كانت هذه إحدى الطرق التى أمكن بها إثبات أن الفيروس يتكاثر فعلاً داخل الحشرة الناقلة له. وقد استخدم Black سنة ١٩٤١ طريقة مختلفة لإثبات تكاثر الفيروس داخل الحشرة، وذلك بأن قام بتغذية مجموعة من نطاط الورق على نباتات إستر، مصابة لمدة يوم واحد، ثم نقلها إلى نباتات استر، واستمر فى نقلها؛ حتى لا تلتقط مصدراً جديداً من الفيروس، وفى خلال ذلك فإنه كان يأخذ ٥٠ فرداً من الحشرة فى ثانى ورابع وثامن واليوم الثانى عشر واليوم السادس عشر، بعد التغذية على النبات المصاب، ويقوم بطحن تلك الأفراد فى محلول فسيولوجى، وتخفيفه تخفيفات مختلفة، ثم تحقن كمية بسيطة من كل تخفيف فى ١٢٠ فرداً من نطاط الورق، الذى لم يتغذ أبداً على نباتات مصابة، ثم تؤخذ الأفراد المحقونة، وتوضع على نبات منيع ضد «فيرس» اصفرار الاستر مثل الشوفان، وتترك لمدة ٣ أسابيع، وبعد ذلك تقسم الأفراد التى ما زالت حية فى كل مجموعة إلى مجموعات من ٥ أفراد، وتغذى على نبات استر واحد سليم لمدة أسبوع، ثم على نبات آخر لمدة اسبوعين. وقد وجد أن قدرة الحشرات المحقونة على «نقل الفيروس» تتزايد بتزايد الفترة التى بقى بها الفيروس فى الأفراد الأولى وهى ٢، ٤، ٨، ١٢، ١٦ يوماً، كما أن التخفيف لم يكن له تاثير ملحوظ مما يدل على أن تركيز «الفيروس» يتزايد فى الحشرة أو بمعنى آخر يتكاثر.

وقد اتبع Maramorosch سنة ١٩٥٢ طريقة حقن الحشرة السليمة بمعلق من ناتج طحن حشرة حاملة لمسبب اصفرار الاستر. وعند حساب تخفيف الفيروس، نجد أنه يخفف ١٠٠٠٠ مرة بعد كل حقنة. وقد قام بحقن مجموعة من ٢٠٠ فرد من نطاط الورق، وأبقاها ٣٠ يوماً على نباتات شوفان منيعة ضد هذا الفيروس، ثم نقلها لمدة يومين على نباتات استر سليمة لتقدير نسبة الانتقال، ثم طحن أفراد من هذه المجموعة وحقنها فى أفراد نظيفة من

الفيروس وتكرار تغذيتها على نباتات شوفان، ثم اختبار قدرتها للعدوى، ثم طحن أفراد من هذه المجموعة وحقن الناتج فى مجموعة ثالثة وهكذا. وقد كرر ذلك ١٠ مرات؛ أى إنه قام بتخفيف الفيروس ١٠ X ١٠ ٤ أى ١٠ ٤٠، وقد وجد أن قدرة الحشرات للنقل لم تتأثر وهذا لا يحدث إلا إذا كان الفيروس يتكاثر فعلاً فى الحشرة.

ب - انتقال الفيروس إلى اجيال الحشرة:

لوحظ فى اليابان فى أوائل القرن العشرين أن فيروس تقزم الأرز **Rice Stunt** ينتقل عن طريق بيض الحشرة الناقلة له نطاط الورق ***Nephotetix apicalis***، وقد أمكن سنة ١٩٣٣ و١٩٣٥ و١٩٤٠ إثبات ذلك، فبتربية أنثى وذكر من هذه الحشرة حاملين للفيروس لستة أجيال، دون أن تتغذى على عائل لهذا الفيروس؛ حتى لا تلتقط مصدراً جديداً للفيروس فإن أفراد الجيل السادس أثبتت أنه مازال حاملاً للفيروس. وقد قدر التخفيف الذى أجرى للفيروس بمروره فى الستة أجيال بنسبة لا تقل عن ١ : ٥٦٣٠٠٠، كذلك تمكن **Fukuschi** سنة ١٩٥٠من إثبات أن فيروس **Clover club leaf Virus** يمكن أن يحمل فى ٢١ جيلاً من أجيال نطاط الورق ***Agalliopsis novella***، وذلك بانتقال الفيروس عن طريق بيض تلك الحشرة، مع أن جميع أفراد تلك الأجيال لم تتغذ على نباتات مصابة.

جـ - أسباب إخفاق الفيروسات فى أن تسبب العدوى بواسطة الحقن أو التلقيح بالعصارة، مع أنها تنتقل بواسطة الحشرات:

معظم الفيروسات التى تمر داخل الحشرة يصعب نقلها بواسطة الحقن بالعصير، ومن غير المعروف حتى الآن سبب إخفاق كثير من الفيروسات فى أن تصيب العدوى بواسطة التلقيح بالعصارة أو بالطرق الميكانيكية مع أنها تنتقل بواسطة الحشرات. **وهناك عدة نظريات تحاول توضيح هذه الظاهرة، ومنها:**

١ - قد يكون تركيز الفيروس فى عصارة فى العائل منخفضاً جداً، حتى أنه لا يمكنه إحداث أى عدوى بالعصير المستخلص، فى حين أن الحشرة الناقلة لهذا الفيروس قد تقوم بتركيزه أثناء التغذية على العصير.

٢ - من المحتمل أن الفيروس يجب أن يدخل خلايا معينة داخل أنسجة النباتات، لا يمكن إيصاله لها بواسطة تلقيح النبات بالعصير، ولكن يمكن للحشرة أن تؤدى ذلك أثناء تغذيتها على العائل. ومن الملاحظ أن معظم الحشرات تتغذى فى منطقة اللحاء، وقد وجد فعلاً أن بعض الفيروسات تكون مركزة فى أنسجة اللحاء، مثل فيروس تجعد قمة بنجر السكر، أما الأنسجة الأخرى فيكون تركيز الفيروس منخفضاً بها، وهذا قد يرجع إلى وجود مواد توقف نشاط الفيروس (Bennett سنة ١٩٣٥) كذلك وجد Storey سنة ١٩٣٨ أن الحشرة الناقلة لفيرس تخطيط الذرة Maize streak virus يمكنها أن تلتقط الفيروس من الخلايا البرانشيمية، ولكن إذاوضعت الحشرة الحاملة للفيروس على ورقة نبات ذرة سليم، بحيث لا يمكن لأجزاء فم الحشرات أن تصل لأنسجة اللحاء، فإن النبات لا يصاب بالفيروس مهما طالت مدة تغذية الحشرة عليه.

وقد يكون ذلك راجعًا إلى أن الفيروس يمكنه أن يتكاثر داخل الخلايا البرانشيمية لنبات الذرة، إذا انتقل إليهما عن طريق خلايا أخرى، ولكن لا يمكن للفيروس أن يتكاثر داخل هذه الخلايا البرانشيمية لانخفاض تركيز الفيروس الذى تفرزه الحشرة.

٣ - قد يكون لسرعة انتقال الفيروسات داخل الأنسجة دخل كبير فى أن بعض الفيروسات التى تنتقل بواسطة الحشرات تخفق فى إحداث العدوى، عند استخدام العصير. فمن المعروف أن بعض الفيروسات التى تنتقل بواسطة الحشرات، تنتقل داخل الأنسجة من مكان حدوث العدوى بسرعة أكبر من الفيروسات، التى تلقح بالعصير. فقد وجد Severin سنة ١٩٢٤ أن فيروس تجعد قمة بنجر السكر، يمكن الكشف عنه على بعد ٣٦ سم من مكان إحداث العدوى بحشرة نطاط الورق *Eutettix tenellus*، وكذلك ٢٠ سم فى فيروس تخطيط الذرة، وذلك بعد ساعة واحدة من حدوث العدوى، وبالعكس نجد أن الفيروسات التى تلقح لها الأوراق بواسطة العصير لا تترك أنسجة الورقة، إلا بعد ٤-٥ أيام. وقد يكون بطء انتقال الفيروس فى خلايا الورقة الملقحة بالعصير هو السبب فى عدم حدوث العدوى؛ حيث إن تلقيح الأوراق بالعصير ومسحوق الصنفرة يسبب جروحًا كبيرة فى الخلايا، قد تكون سببًا فى موت الخلايا،

وبالتالى عدم إمكان الفيروس من التكاثر بداخلها، أو عدم إمكانه الانتقال إلى خلايا سليمة لبطئه فى الانتقال. هذا بعكس ما يحدث فى حالة تغذية الحشرات فى خلايا اللحاء أو خلايا الخشب، فلو أن الجروح التى تسببها الحشرة للخلايا قد تسبب موتها، إلا أن مثل تلك الخلايا يوجد بها نشاط فسيولوجى كبير لانتقال الأغذية بداخلها؛ مما يجعل الفيروس ينتقل من الخلية المجروحة قبل أن تموت إلى خلايا أخرى سليمة.

٤ - أن الفيروسات التى تنتقل بواسطة الحشرات تتوقف عن النشاط، ولا يمكنها إحداث العدوى إذا استخلص العصيرمن النبات؛ أى إنها تبقى نشطة ما دامت داخل أنسجة النبات غير المجروحة - وكذلك عندما تكون داخل الحشرة الناقلة لها. وقد تكون هذه النظرية صحيحة مع بعض الفيروسات، ولكن نجد أن Storey سنة ١٩٣٣ قد أثبت خطأ تلك النظرية مع فيروس تخطيط الذرة؛ حيث قام باستخلاص عصير نبات ذرة مصاب بالفيروس، ثم قام بحقنه فى نطاط الورق *Cicadulina mbila*، وأمكن للحشرة أن تعدى نبات ذرة سليمًا، مع أنه لم يمكن إحداث العدوى بتلقيح الأوراق بالعصير.

وقد توصل Bennett سنة ١٩٣٥ إلى النتيجة نفسها مع فيروس تجعد قمة بنجر السكر؛ حيث إنه بتغذية نطاط الورق الذى ينقل هذا الفيروس على محلول سكرى من مستخلص نباتات مصابة، أو محلول سكرى من مستخلص الحشرات الحاملة للفيروس، فإن الحشرات تحدث العدوى عندما تتغذى على نباتات بنجر سكر سليمة. وعلى العموم فقد وجد أن هذا الفيروس من الفيروسات الثابته Stable فهى تبقى ٢٨ يومًا فى حالة نشطة على درجة حرارة الحجرة ونقطة توقف نشاطها بالحرارة هو ٧٥م°، ويمكن لهذا الفيروس كذلك أن يبقى نشطًا لمدة ساعتين فى كحول ٩٠٪.

وهذه النتائج التى توصلوا إليها تدل على أن الكمية اللازمة من الفيروس لإحداث العدوى تكون بسيطة جداً، وقد اقترح أن مثل هذه الكمية لا يمكنها أن تحدث عدوى بتمريرها على الأوراق.

٥ - عند استخلاص عصير النبات المصاب بالفيروس، وذلك بطحن أنسجة النبات، فإن

الفيروس قد يلتصق أو يتحد مع مركبات تجعله غير قابل لإحداث العدوى عند تمرير العصيرعلى سطح أوراق العائل، ولكن عندما تتغذى الحشرة على عصارة النبات.. فإنها تستخلص وتفصل الفيروس من تلك المواد اللاصق بها، أو تفصله عن المواد التى توقف نشاطه.

د - الطريق الذى تسلكه الفيروسات داخل الحشرة :

الطريق الذى تسلكه الفيروسات داخل الحشرات التى تنقلها (من ذوات الفم الثاقب الماص) هو أنها عندما تصل إلى المعدة فإنها تنفذ خلال جدارها إلى الدم، ومنها إلى الغدد اللعابية حيث تختلط باللعاب، ثم تمر مع اللعاب إلى أنسجة العائل، عندما تتغذى عليه الحشرة. وقد تمكن Storey سنة ١٩٣٢ من إثبات ذلك أثناء ملاحظاته أن نطاط الورق *Cicodulina mbila* الذى ينقل فيروس تخطيط الذرة، له سلالة لا يمكنها أن تنقل هذا المرض. وقد وجد أن الفيروس يوجد فى معدة ودم السلالة الناقلة للمرض ولكن الفيروس لايوجد إلا فى المعدة فقط فى السلالة التى تنقل المرض. ولقد تمكن من تحويل السلالة الأخيرة إلى حالة تتمكن منها أن تنقل المرض، وذلك بعمل ثقب فى معدة تلك السلالة قبل التغذية، أو بعد التغذية مباشرة على العائل المصاب.

ويعتقد أن الدم هو المخزن الرئيسى للفيروس داخل الحشرة؛ حيث ينتقل ببطء إلى الغدد اللعابية، حيث يختلط باللعاب، فقد وجد Storey فى الكشف عن فيروس تخطيط الذرة فى الغدد اللعابية لنطاط الورق الذى ينقله.

كذلك وجد Bennett and Wallace سنة ١٩٣٨ أن تركيز فيروس تجعد قمة بنجر السكر فى الغدد اللعابية لنطاط الورق *Circulifer tennelus* أقل بكثير من تركيزه فى الأنسجة الأخرى.

ومن الدلائل التى تدل على أن الغدد اللعابية ليست المخزن الطبيعى للفيروس داخل جسم الحشرة، هو أنه لو قمنا بتغذية حشرة حاملة للفيروس على عدة نباتات سليمة بالتوالى بحيث تبقى على كل نبات مدة معينة.. فإننا نجد أن بعض تلك النباتات لاتصاب

بالفيروس. ويزيد احتمال الإصابة كلما زادت المدة التى تقضيها الحشرة على النبات، ويرجع هذا غالبًا إلى أن الفيروس تنتهى كميته من الغدد اللعابية بسرعة، مع عدم مرور فيروسات بطريقة منتظمة من الدم إلى الغدد، وبذلك تبقى الغدد بعض الوقت خالية من الفيروس، وفى هذه الحالة لا تحدث عدوى للنباتات. وبزيادة مدة تغذية الحشرة على النباتات فإن احتمال مرور الفيروس من الدم إلى اللعاب يزداد، وبذلك يزداد احتمال انتقال الفيروس إلى العائل وحدوث العدوى.

وغالبًا ما يمر معظم جزئيات الفيروس من جدران المعدة إلى الدم، فقد وجد أن قليلاً جداً من الفيروس يمر مع البراز.

ومن العلاقات الغريبة بين أحد الفيروسات والحشرة الناقلة له هو ما يحدث مع فيروس الذبول المبقع فى الطماطم (Tomato spotted wilt virus (TSWV، الذى ينتقل بواسطة التربس *Thrips tabaci*، وهنا نجد أن الحورية والحشرة الكاملة يمكنها نقل الفيروس، ولكن نجد أن الحشرة الكاملة لكى تكون ناقلة للفيروس، يجب أن تكون قد تغذت على العائل المصاب أثناء كونها حورية، وليس بعد أن تكون حشرة كاملة، ولو أنه لا يوجد أى اختلاف بينها فى طريقة التغذية، إلا أنه قد يكون هذا الاختلاف ناتجًا عن عدم نفاذية معدة الحشرة الكاملة للفيروس، مما يؤدى إلى خروجه مع البراز.

وحتى الآن لا تعرف كيفية انتقال الفيروس من المعدة إلى الدم، وكيف أنه ينفذ من أغشية نصف منفذة لم يلاحظ فيها جروح أو ثقوب. وعلى العموم نجد أن كثيراً من الحشرات تلتقط فيروسات مختلفة من عوائل مصابة بها، ولكن هذه الحشرات لا تنقل تلك الفيروسات لأنها تمر إلى الخارج مع البراز دون أن تمر إلى الدم، وهذا قد يرجع لعدم نفاذية معدة تلك الحشرات لهذه الفيروسات، إلا أنه قد وجد أنه بحقن بعض تلك الحشرات بفيروسات لا تنقلها فى دمها، أو بعمل ثقوب فى معدة تلك الحشرات بعد تغذيتها على فيروس لا تنقله هذه الحشرات، فإن تلك العمليات لا تحولها إلى حشرات ناقلة لتلك الفيروسات.

وفى هذه المجموعة من الفيروسات التى تمر داخل الحشرة، نجد أن هناك فيروسًا ينتقل بواسطة حشرة الخنفساء *Phaedon ecochleariae*، وهنا يعتقد أن المدة التى تلزمها الحشرة ليمكنها إحداث العدوى، تختلف فى مسببها عن الفيروسات التى تنتقل بواسطة حشرات ذات فم ثاقب ماص، والتى تمر داخل جسم الحشرة، ففى حالة فيروس التبرقش الأصفر للفت، فإن الفيروس يدخل مع الأغذية الممضوغة إلى المعدة، ثم يخرج ثانية عندما تستفرغ الحشرة أثناء التغذية فتحدث العدوى.

فترة بقاء الفيروس داخل الحشرة لإمكان حدوث العدوى: Latent period

وهذه الفترة هى أهم خاصية من خواص الفيروسات الباقية؛ حيث يجب أن تمر على الحشرة فترة معينة بعد التغذية على نبات مصاب؛ حتى يمكنها أن تنقل الفيروس، وهذه الفترة تتراوح ما بين ساعة إلى أكثر من أسبوعين حسب الفيروسات.

ومن غير المعروف لزوم هذه الفترة للفيروس؛ لكى تتمكن الحشرة من إصابة العائل، إلا أن هناك عدة نظريات، منها:

١ - أن هذه الفترة تلزم للفيروس؛ لكى تتغير قدرته فى إحداث العدوى، أى إنه يجب أن تمر ببعض التغييرات داخل جسم الحشرة؛ حتى يمكنه إحداث العدوى لعائل آخر، إلا بعد أن يمر داخل الحشرة الناقلة له، فتحدث له التغيرات المختلفة، التى تسبب قدرته على إحداث العدوى من جراء هذه التغيرات. وهذه النظرية من النظريات التى تقدم بها البعض لتوضيح سبب عدم إمكان بعض الفيروسات أن تنتقل بواسطة التلقيح بالعصير، مع أنها تنتقل بواسطة الحشرات.

إلا أن Storey أخفق فى إحداث العدوى لنباتات الذرة لفيروس تخطيط الذرة، وذلك باستخدام مستخلص نطاطات حاملة لهذا الفيروس، بعد طحنها كمصدر لعدوى تلك النباتات، مع أنه أمكنه أن يحول حشرة نظيفة من هذا الفيروس إلى حشرة ناقلة له يحقنها بهذا المستخلص. وهذه التجربة لا تدل قطعًا على أن التغيير فى قدرة

الفيروس على إحداث العدوى لاتحدث فى جسم الحشرة فقد يحدث ذلك، ولكن الفيروس لم يتمكن من إحداث العدوى بالطرق الميكانيكية لأحد الأسباب التى ذكرت من قبل.

٢ - أن هذه الفترة هى المدة التى يأخذها الفيروس للمرور داخل جسم الحشرة من وقت تغذية الحشرة على العائل المصاب إلى أن يفرز بواسطة الحشرة.

٣ - أن الحشرة تلتقط كمية بسيطة جداً من الفيروس أثناء تغذيتها على العائل المصاب؛ حتى أن هذه الكمية لا يمكنها إحداث العدوى؛ لذا يتكاثر الفيروس داخل جسم الحشرة إلى أن يصل إلى التركيز الذى يمكنه إحداث العدوى عنده، وبذا تمضى فترة قبل أن تتمكن الحشرة من إحداث العدوى.

سابعًا: انتقال الفيروسات بواسطة بعض أنواع الحلم والعناكب:

Transmission of plant viruses by mites

هناك مجموعة من الحلم (الأكاروس) والعناكب Eriophyidae تعرف بقدرتها على نقل بعض الفيروسات، التى تسبب أمراضًا فى النبات. يبلغ طول هذه الناقلات حوالى ٢ر٠ ملم، ولها أربعة أرجل فقط، ولها خرطوم دقيق تستخدمه فى اختراق خلايا النبات، التى تتغذى عليها ويسهل اللعاب الذى تفرزه غدد اللعاب عملية غرز الخرطوم فى خلايا النبات وحركته وامتصاص المواد الغذائية.

وهذه الكائنات لها مدى عوائلى محدود من النباتات التى تتغذى عليها؛ إذ إنها تتغذى على الأوراق والبراعم والأجزاء الغضة الأخرى من النبات.

ويبين الجدول (٨ - ٥) الفيروسات التى تنتقل بواسطة الحلم والعناكب.

جدول (٨ - ٥) : الفيروسات التى تنتقل بواسطة العناكب والحلم وبعض خصائصها.

الفيروس	الناقل	النسبة ٪ للنقل بالعناكب	طرق النقل الميكانيكى
أولاً : فى النجيليات :	**Grasses**		
١- فيروس التخطيط الموزايكى فى القمح	*Aceria tulipae*	٣٤	النقل الميكانيكى
٢- فيروس الموزايك المبقع فى القمح	*A.tulipae*	٦٥	—
٣- فيروس موزايك الشليم	*Abacarus hystrix*	٣٠	ميكانيكى
٤- فيروس موزايك الأجروبايرون	*A.hystrix*	أقل من ١٪	ميكانيكى
ثانياً : فى النباتات المعمرة :	**Woody perennial**		
١- فيروس ارتداد النبق الأسود	*Phytoptus ribis*	< ١٪	بالتطعيم
٢- فيروس موزايك التين	*Aceria ficus*	٧٠٪	بالتطعيم
٣- فيروس موزايك الخوخ	*Eriophyses insidiosus*	٢,٥٪	بالتطعيم
٤- فيروس عقم الحمام	*Aceria cajanus*	أقل من ١٠٪	بالتطعيم
٥- فيروس تورد الورد	*Phyllocoptes fructiphilus*	أقل من ١٠٪	بالتطعيم

ثامناً : نقل الفيروسات فى حبوب اللقاح :

Pollen transmision of plant viruses

ينتقل عديد من فيروسات النبات من نبات مصاب إلى نباتات سليمة بواسطة حبوب اللقاح Pollen grains حيث تحمل حبوب اللقاح من النبات المصاب بواسطة الحشرات أو الرياح إلى ازهار النباتات السليمة.

وفى تجارب على مرض موزايك الفاصوليا العادى الفيروسى Common bean mosaic وجد بأنه لدى إخصاب إزهار نباتات فاصوليا سليمة بحبوب لقاح من نبات مصاب، كانت البذور المصابة ٢٥٪ كما نتجت النسبة نفسها، عندما أخذت حبوب اللقاح من نبات سليم واستخدمت لإخصاب أزهار فى نباتات مصابة.

ويعتقد بأن انتقال الفيروسات عن طريق حبوب اللقاح يتم بواسطة الجاميطات الذكرية، التى تتحرك داخل أنبوبة اللقاح التى تخترق الكيس الجنينى، وتتحدد إحدى الجاميطات الذكرية مع خلية البيضة مكونة الجنين، وتتحد الأخرى مع النواة القطبية Pollar nuclei مكونة الإندوسبرم.

هذا.. وقد سبق مناقشة انتقال الفيروسات النباتية وإصابة البادرات عن طريق الفيروس المحمول خارج الجنين أو انتقال الفيروسات التى تحمل فى الجنين والعوامل التى تؤثر فى ذلك عند دراسة طرق انتقال الفيروسات عن طريق البذور.

الانتقال الحشرى المعقد للفيروسات ومعاونيها:

Complexes of transmission - Dependent and helper viruses

اعتمدت معظم الدراسات التى تناولت النقل الحشرى للفيروسات النباتية على دراسة الإصابة بفيروس واحد محدد حيث تعطى أهمية كبيرة بقدر الإمكان لتحضير الفيروس المسبب للمرض بصورة نقية من أجل تبسيط النتائج المتحصل عليها فى التجارب، فغالباً ما يلجأ الباحثون إلى تحضير مستخلص نقى للفيروس من الناحية الوراثية (Clonal purity) غير أنه فى الطبيعة نادراً ما يتسبب فيروس واحد بمفرده فى إحداث الإصابة، فالشائع أن هناك خليطاً من الفيروسات تتواجد فى منطقة الإصابة ووجدت أمثلة كثيرة لفيروسات مرضية وكائنات شبيهة بالفيروسات تتفاعل مع غيرها من الفيروسات بطرق متعددة قد تصل إلى حد الاعتماد على هذا التفاعل للبقاء أو لإحداث الإصابة، ويشير بعض الباحثين أن جميع الصور المحتملة لحدوث هذا التفاعل بين المعقد الفيروسى يحتمل تواجدها فى الطبيعة إلا أن أكثر الأمثلة وضوحاً هى تلك الفيروسات التى تفتقد بعض الوظائف الحيوية رغم تواجد مثل هذه الوظائف فى فيروسات أخرى ولذا فهى تعتمد عليها، وقد أشارت بعض البحوث الحديثة إلى مثل هذه الظاهرة والتى أطلق عليها الفيروسات التابعة Satellites نتيجة اعتماد بعض الفيروسات فى المعقد الفيروسى على غيرها من الفيروسات فى أداء بعض الوظائف الحيوية ويطلق على هذه الفيروسات Satellite viruses وأوضح مثال لها هو

الفيروس المسبب لنيكر وسيس الدخان، غير أنه توجد حالات أخرى لا يعتمد فيها الفيروس التابع فقط على أداء الوظائف الحيوية التى يفتقدها ولكن يتخطى ذلك ليعتمد عليه فى الانقسام وفترة الحضانة والانتقال عبر الناقل الحشرى وفى هذه الحالة تسمى الظاهرة بـ-Satellite RNA molecules، كما فى حالة المعقد الفيروسى المسبب لموزيك الخيار Cucumo virus والمعقد الفيروسى المسبب لمرض الإسوداد الحلقى فى الطماطم Nepovirus فكلاهما يعتمد على فيروس آخر للتكاثر (الاستنساخ) مروراً بفترة الحضانة والمساعدة على النقل من خلال ناقل حشرى يكون ناقلاً للفيروس المستقل رغم أنه غير معروف كناقل للفيروس التابع، كما توجد حالات أخرى لظاهرة الاعتماد فى المعقد الفيروسى حيث يعتمد الفيروس التابع على الفيروسات الأخرى فقط فى الانتقال من خلال الناقل الحشرى (وليست لزيادة المقدرة على التكاثر داخل الأنسجة النباتية المصابة) بمعنى أن هذه الفيروسات التابعة تكون هى المسئولة عن إحداث المرض ولا يثبت انتقالها سواء بالحشرات أو بالنقل الميكانيكى وتعتمد فى الانتشار على فيروسات أخرى تساعدها فى الانتقال من خلال الحشرات، وهناك العديد من الأمثلة المتعارف عليها حالياً والتى تؤكد وجود تفاعل بين معقد فيروسى يتكون من فيروس تابع يعتمد فى انتقاله على الفيروس الآخر.

تباين المعقدات الفيروسية التى تضم فيروسات تابعة:

Complexes involving transmission defective varients

أ - مجموعة Potyvirus:

تتضمن تلك المجموعة فيروسات تتميز بوجود الحامل النووى بها فى جزيئات طويلة قد يصل طول الشريط إلى ٧٥٠ نانوميتر ويمكنها الانتقال ميكانيكياً عن طريق المن بوسائل الانتقال التقليدية (بدون حضانة)، وهذه الفيروسات يكون بها شريط الحامض النووى RNA فردى (ss RNA single stranded) وقد يصل الوزن الجزيئى للحامض النووى إلى ٩,٥ Kb ويوجد بها غطاء بروتينى مميز، وأول من أشار إلى وجود هذه الظاهرة فى هذه المجموعة من الفيروسات Bawden & Sheffeld (1944) and Gera et al, (1997)، الذى

تناول أحد فيروسات هذه المجموعة الغير معروف عنه الانتقال من خلال المن والمعروف بفيروس البطاطس (C) إلا أن هذا الفيروس يعتبر الآن سلالة لفيروس البطاطس (Y) بعد اكتشاف انتقاله اعتماداً على غيره من الفيروسات من خلال المن. والأكثر من ذلك أن هناك بعض الباحثين Kassanis & Govier (1971) يعتقدون أن PVY نفسه لا يمكنه الانتقال من خلال المن اعتماداً على ذاته ولكن اعتماداً على عزلات أخرى يمكنها الانتقال من خلال المن تتواجد فى المعقد الفيروسى فى الأنسجة النباتية المصابة ويعتقد أن الفيروس المساعد فى إصابات البطاطس بفيروس لا يحتوى على غطاء بروتينى.

جميع فيروسات هذه المجموعة (Potyviruses) معروف عنها أنها تحتوى على مثل هذا الغطاء البروتينى (Hc or helper component)، كما توجد بها ظاهرة القصور فى الانتقال فتعتمد على فيروسات مساعدة ومنها الفيروس المسبب لمرض الموزيك الأصفر فى الفول (BYMV) والفيروس المسبب للبثرات على أشجار البرقوق (PPV) (من نفس مجموعة الفيروسات المسببة للحصبة) حيث تشبه البثرات التى تسببها بثرات الحصبة، ومرض تآكل أوراق الدخان (TEV) ومرض الموزيك الأصفر فى الكوسة (ZYMV).

فى فيروس (PVY) يبدو أن القصور فى القدرة على الانتقال لا يرجع إلى فشله فى إنتاج البروتين ، ولكن إلى اختلافات بسيطة فى تركيب البروتين الخاص به عن تركيب الـ بروتين، وقد ثبت ذلك من الدراسات السيرولوجية، وبمقارنة تتابع الأحماض الأمينية فى بروتين الـHc المتحصل عليه من فيروسات تنتقل عن طريق المن وتنبع مجموعة الـ Potyviruses وجد أن جميعها يختلف عن التتابع فى بروتين Hc حتى PVY، وفى أمثلة أخرى تتعلق بفيروس (TEV) أو (ZYMV) فإن القصور فى عملية الانتقال من خلال المن يرجع للغطاء البروتينى للفيروس وليس إلى الـHc بروتين، وعلى العموم فقد وجد أن تتابع الأحماض الأمينية فى غالبية فيروسات هذه المجموعة تتميز بوجود تعديل فى نسبة وترتيب الأحماض الأمينية الثلاثة الأسبارجين والأنالين والجلايسين فى نهاية الغطاء البروتينى وغير موجودة فى فيروسات نفس المجموعة التى لا يمكنها الانتقال عن طريق المن وعلى عكس ذلك فبعض

فيروسات (TEV) يمكنها الانتقال عن طريق المن بعد اكتساب بروتين الـ Hc الخاص بـPVY مما يؤدى إلى الاعتقاد إلى أن التفاعل فى هذه الحالة يرجع للتفاعل بين بروتين Hc فى كلا الفيروسين.

وقد أشار عديد من الباحثين إلى قدرة بروتين الـ Hc لأحد فيروسات هذه المجموعة فى مساعدة غيرها من الفيروسات فى الانتقال عن طريق المن Lecog & Pifrat (1985).

ب – مجموعة Caulimoviruses :

يبلغ الطول هنا حوالى (50 nm) وتحتوى فيروسات هذه المجموعة على شريط مزدوج من الحامض النووى DNA (ds) حوالى 8 Kbp وجزيئات بروتين فردية.

والمعقد الفيروسى المسبب لموزيك القرنبيط CaMV يبدو أنه قابل للانتقال من خلال المن من خلال فترة حضانة (نصف باقى) وتعتمد فى ذلك على بروتين الـHc بنفس الطريقة التى تم ذكرها فى مجموعة Potyviruses فهذه الفيروسات معروفة أنها لا تكون جزيئات بروتين، وقد وجد أن هذا المعقد الفيروسى يمكنه الانتقال من خلال المن إذا احتوى على بروتين Hc من سلالات تنتقل بالمن ووجد أن المن يمكنه نقل هذا المعقد الفيروسى عقب تغذيته على أغشية بلازمية لأنسجة مصابة ببروتين Hc مأخوذ من سلالات يمكنها الانتقال عن طريق المن مثل PVY أو TEV بمعنى أن بروتين الـHc المأخوذ من PVY أو TEV هو الذى يلعب دور العامل المساعد فى انتقال CaMV من خلال المن.

ومحتوى الفيروس CaMV Hc يكون عبارة عن Kda - 18 بروتين (P18) حيث تساعد تلك البروتينات على حل الشفرة الخاصة بالجينوم الفيروسى وكل من (P18) والمساعدات النشطة تكون متعلقة مع محتويات الخلايا المتضمنة لها I.

وباختبار نوعين من المن الغير ناقل لسلالات الفيروس CaMV اتضح أن واحد منهما يكون أشكال خاصة على النبات من البروتين المعتاد والأنتيسيرم (P18) بينما الآخر يكون 184 - CM_4 لمدة أطول مقارنة بالنوع الأول. على أى حال فى الخلايا المصابة بسلالات

CaMV يتضح فيها غياب (P18) فى الخلايا المحتوية لها، وقد وجد من الأبحاث أن هناك أنواع من المن تحتوى على كميات قليلة من البروتين ORF II حيث شوهدت فى زوج فقط من السلسلة المكونة للحامض النووى مختلفة عن سلالات المن الأخرى الناقلة. هذا ويلاحظ أن أى اختلاف فى نتائج الأحماض الأمينية المتبادلة من الجليسين إلى الأرجنين يحدث فقد فى الوظائف المساعدة.

جـ - مجموعة **Pea enation mosaic virus**:

يبلغ الطول حوالى 28 nm وتنقل بواسطة نوع من المن متخصص فى نقلها مثل *Acyrthosiphon pisum* حيث الانتقال يتم بالنسبة للفيروسات من النوع الباقى، ومن أمثلة المعقدات الفيروسية التابعة لهذه المجموعة هذا المعقد الفيروسى المسبب لمرض PEMV فالمعروف أن هذا الفيروس لا ينتقل عن طريق المن إلا أن هناك بعض السلالات التى يمكنها الانتقال عن طريق المن.

ويختلف هذا المعقد عن المجموعتين السابقتين فى أن المن الذى يكتسب عزلات تنتقل بالمن (T) لا يمكنها نقل عزلات (NT) فالعزلات التى يمكنها الانتقال بالمن (T) تحتوى على حامض نووى فردى ونوعين من البروتين بينما العزلات التى لا يمكنها الانتقال عن طريق المن (NT) يقل الوزن الجزيئى للبروتين الموجود فيها بشكل واضح عن العزلات (T) بمعنى أن هذا المعقد الفيروسى يحتوى على نوع بروتينى يتواجد فى العزلات (T) ولا يتواجد فى العزلات (NT) ولا يعتمد إطلاقاً على البروتين كما هو الحال فى المجموعتين السابقتين.

Complexes involving related viruses with different veetor specificites:

كل الفيروسات يمكن وصفها تحت هذا العنوان التى تتبع مجموعة Luteoviruses، فالفيروسات تحت هذه المجموعة يبلغ طولها 25 nm ويمكن نقلها بواسطة المن ويمكن وضعها تحت مجموعة الفيروسات الدورية الغير تكاثرية، وكل فرد من هذه المجموعة يمكن نقله

بواحد أو عديد من أنواع المن. وهناك نوعين من الفيروسات التى تسبب أعراض الإصفرار فى نبات الشعير فهى تحتاج إلى ناقلات خاصة مثال ذلك فيروس BYDV - MAV تنتقل بواسطة ***Sitobion (formerly Macrosiphum) avenae*** وفيروس BYDA - RPV تنتقل بواسطة ***Rhopalosiphum padi*** وفى الحقيقة هذين النوعين من الفيروسات ليس لها علاقة سيرولوجية ببعضهما البعض.

ولقد وجد أن فيروس (BYDV) يمكن نقله بواسطة R. padi حيث يكون مخلوطاً مع الفيروس الآخر فى نفس النبات (نبات الشعير) حيث يحدث خلط بين هذين النوعين من الفيروسات فى الإصابة النباتية ويمكن حقنهما من خلال الهيموكول مع مستخلص النبات حيث لا ينتقل فقط فيرس RPV ولكن ينقل أيضاً MAV وفى الواقع أن فيرس MAV لا ينتقل بواسطة R. padi نتيجة تغذية الناقل المتكررة على النباتات المصابة حتى لو كان النبات محقون بكل من الفيروسين على حدة أو حتى لو كانا محقونين خليطاً مع بعضهما بصورة نقية.

وفى تجربة أخرى عند معاملة المستخلص النباتى المحتوى على الخليط الفيروسى مع الأنتسيرم الخاص بـ RPV قبل الحقن أمكن نقله بواسطة المن المختص ولكن لم يمكن النقل عند تكرار التجربة السابقة فى حالة استخدام انتسيرم MAV.

ومن خلال تلك التجارب يمكن استنتاج أن خليط النباتات المصابة بـ MAV RNA يغلف الـRPV بغطاء بروتينى حتى يمكن نقله بواسطة R. padi هذه الحزمة من الحامض النووى للفيروس MAV لتكوين الغطاء البروتينى للفيرس الآخر RPV هذه العملية تعرف بـRrans - capsidaiton أو تسمى Phenotypic mixing، وهذا يعنى تغليف الحامض النووى للفيرس RPV بخليط من الغلاف البروتينى لكلا الفيروسين.

من الدراسات والملاحظات من خلال استخدام الميكروسكوب الإلكترونى لدراسة المجموعة Luteoviruses من حيث تكوين الغطاء البروتينى لوحظ أن المن A. avenae استطاع نقل الفيرس RPV بعد تغليفه بالغلاف البروتينى من قبل الفيرس الآخر MAV.

وهذا يوضح أن تخصص الناقل يعتمد أولاً على الأغلفة البروتينية التى تتكون بواسطة الفيرس.

ميكانيكية الاعتماد Mechanism of depends:

كل الفيروسات مثل كل الكائنات الراقية عبارة عن تجمع من الجينات يعتمد كل منها على الآخر ليستطيع القدرة على البقاء، فلو أن جين توقف عن العمل أو نقص فإن غياب وظيفته يمكن فى بعض الأحيان أن تكتسب عن طريق عزلة أخرى من نفس الفيرس أو عن طريق فيرس آخر، وهذه الطريقة تعرف بالتكامل Complementation.

كل الفيروسات المتداخلة النقل هى مثال طبيعى لحدوث التكامل، والفيرس الذى يقوم بالمد للوظيفة المفتقدة هو الفيرس المساعد. فعندما تكون جينات الفيرس موجودة فى أماكن مختلفة بالنسبة للمحتوى الجينى المقسم فيكون هناك فرصة لأن تنفصل هذه الجينات ويعاد التحامها على أجزاء أخرى من المحتوى الجينى، ووفقاً لهذه الاحتمالات فقد وجد بالتجريب إمكانية حدوث هذه الظاهرة على سبيل المثال فى موزيك الخيار Cucunovirus، وأيضاً فى التبقع الحلقى فى العليق Nepovirus حيث أن واحد أو أكثر من أجزاء المحتوى الجينى فى أحد هذه العزلات لها القدرة على استقبال الغطاء البروتينى من عزلة أخرى وهذه العملية أو هذا الاكتساب هو انتقال متخصص، وفى الغالب إن هذا النوع من انتقال الجينات أيضاً يحدث فى الطبيعة، وهذه ليست خطوة كبرى لهذه الظاهرة التى وجدت فى الاصابات المختلفة فى بعض Luteoviruses مثل RPV, MAV حيث إن دخول المحتوى الجينى يمكن أن يكون عن طريق الغلاف البروتينى ولهذه الأسباب فإن النقل يكون متخصص جداً من فيرس إلى آخر وهى فقط خطوة بسيطة لإيضاح وظيفة هذه العملية التى وجدت مثلاً بالـ Umbraviruses التى لا تحتوى على ناقل لما تمتلكه من جينات ولكنها تعتمد على أجزاء من RNA تستطيع أن تلتحم بالغلاف البروتينى للفيروسات التى تساعدها، عادة الـ Luteoviruses ليحدث النقل عن طريق ناقل متخصص من هذا الفيرس. وهذه الظاهرة (نقل أجزاء من كبسولة الفيرس Transcapsidation) هى أحد الطرق الأساسية فى الاعتماد

على النقل أو الانتقال.

ومن أهم الطرق التى يعتمد عليها النقل وجدت فى الفيروسات التى تحتاج إلى بروتين مساعد Hc وهى عزلات ينقصها وظائف الـHc فهى تستعيرها من فيروسات أخرى.

النوع الثالث من التفاعل أكثر دقة عن الطرق السابقة التى وجدت وهو وجد فيه /HLV HV6 complex التى تلتحم بنهايات القواعد البروتينية لجيناتها وميكانيكية هذه الطريقة غير معروفة ولكنها يمكن أن تعتبر نموذج خاص جداً فى التجانس بالنسبة لنهايات الأجزاء البروتينية لها. وأخيراً يوجد هناك GRP يتبعه RNA الذى يمنحه وظيفة غير معلومة لتساعد الـ GRAV الذى يعتمد على النقل عن طريق المن فى الـ GRV وهذا سجل فقط تابع من RNA يعمل فى هذا الاتجاه ولذلك فإن وجود هذا الـ RNA هو هام جداً ليتم النقل بفاعلية فى فيرس اصفرار العروق فى البنجر ولو أنه مازال غير معلوم كيفية التفاعل.

الفيروسات الممرضة للنبات التى تفضل وجود فيروسات مساعدة:

Virus groups likely to contain helper viruses

طبقاً للمعلومات المتاحة حالياً فإنه توجد أنواع معينة من الفيروسات الممرضة للنبات التى تعتمد أكثر من غيرها على وجود فيروسات مساعدة لإحداث الحالة المرضية وعلى ما يبدو فإن هذه الأنواع تنحصر فى ٣ مجاميع هى:

.potyviruses, caulimoviruses and the viruses in the AYV/RTSV/MCDV

ويلاحظ أن هذه المجاميع الثلاثة تنتج بروتين Hc، وكما سبق القول فإن مجموعة فيروسات Caulimoviruses لم يثبت حتى الآن أنها تساعد المن فى نقل الفيروسات الغير مرتبطة بهذه المجموعة فى الطبيعة، وبالرغم من ذلك فهى على ما يبدو مؤهلة تماماً للقيام بهذا الدور، وينطبق ذلك أيضاً على فيروس MCDV ويتشابه هذا الفيرس مع فيرس AYV، RTSV فى الخصائص الجزيئية وثبات العلاقة مع الناقل الحشرى إلا أن هذا الفيرس MCDV يدفع عملية تكوين ما يعرف بـ inclusion bodies فى خلايا الناقل الحشرى ولقد وجدت

جزيئات بروتين هذا الفيرس وكذلك فيرس AYV فى أماكن محددة فى أنسجة Leafhop-pers فى نطاطات الأوراق، وهذا التشابه يدعو للاعتقاد بأن الفيرس MCDV قد يكون مكوناً للبروتين Hc بالرغم من عدم وجود أى أدلة على ذلك. وتشير الدراسة إلى أن هذا الفيرس بالذات MCDV قد يكون قادراً على مساعدة نطاطات الأوراق فى نقل الفيروسات الغير قادرة على إحداث الإصابة بدون مساعدة خارجية، وتجدر الإشارة إلى أن هناك مجموعة أخرى من الفيروسات تعرف بـ Luteoviruses تحتوى على العديد من الفيروسات التى تستطيع أن تلعب دور الفيروسات المساعدة، إلا أن ميكانيكية الاعتماد فى النقل فى هذه المجموعة تنحصر فى النقل الميكانيكى العشوائى ولا توجد أسباب مقنعة لتفسير السؤال التالى لماذا لا يتم نقل الفيروسات الغير باقية، والفيروسات النصف باقية بمثل هذه الطريقة من ميكانيكية النقل، فلا توجد بحوث بهذا الخصوص سوى بحث واحد عن نقل فيرس ZYMV التابع لمجموعة Potyvirus والذى ينتج فى خليط من الفيروسات. وبهذا الخصوص يعتقد أن هناك علاقة ما بين أطول جزئيات الفيرس خاصة فى العلاقة بين فيرس HLV، HV6 فالفيروسات ذات الجزيئات الطويلة تعمل غالباً كفيروسات مساعدة للفيروسات ذات الجزيئات القصيرة.

مجاميع الفيروسات الممرضة التى تضم فيروسات غير قادرة على الانتقال الذاتى:

Virus groups likely to contain dependant viruses

يمكن القول بصفة عامة بأن مجموعة فيروسات Umpraviruses تضم عديد من فيروسات باقية ويمكنها التكاثر داخل أنسجة الناقل الحشرى Aphid borne viruses وتدخل هذه المجموعة Luteoviruses بصفة أساسية ضمن الفيروسات التى ينقلها المن ويمكن تعميم القول بأن أى **فيروسات تشابه هذه المجموعة فى الخصائص العامة لجزيئات الفيرس يمكنها أن تنتقل بالمن وتعتبر من الفيروسات المعتمدة وهذه الخصائص تنحصر فى:**

١ – عدم وجود جزيئات تشابه الفيرس فى المستخلصات النباتية لنباتات معدية ميكانيكياً.

٢ – قلة الذوبان فى المذيبات العضوية.

٣ – إمكانية تحضير جزيئات الحامض النووى RNA من أوراق مصابة بشدة.

٤ – وفرة جزيئات الحامض النووى المزدوج RNA فى الأوراق المصابة بشدة مع تشابه البروتين المفصول بطريقة الفصل الكهربى مع بروتين فيروسات هذه المجموعة.

واكتشاف معقد الفيرس HV6، HLV أدى إلى اقتراح أن أى فيروسات لا يمكنها الانتقال بطريقة مستقلة يمكن أن تتواجد فى مجاميع فيروسية أخرى خاصة تحت مجموعة ACLV وهى فيروسات غير معروف طرق النقل فيها فيما عدا الفيرس Grape vine virus والذى يصيب العنب والمعروف أنه ينتقل عن طريق الخنافس فى إسبانيا، كما ذكر العالم زابالجو جيزاوا وآخرون (عام ١٩٩٧) Zabalgogeazeoa et al، ويؤكد هذا الاعتقاد أن فيروسات ACLV تتشابه فى خصائص جزيئاتها مع فيرس HLV وأنها تنتمى إلى مجموعة GVA (التى تعتمد على طرق الفحص السيرولوجية).

وعلى ما يبدو فإن الفيروسات غير المستقلة تميل للتواجد كعزلات غير مؤثرة داخل مجموعة الفيروسات المنتجة للبروتين Hc.

الباب التاسع

وبائية فيروسات النبات

Epidemiology of Plant Viruses

وبائية فيروسات النبات

Epidemiology of Plant Viruses

لدراسة مقاومة الأمراض الفيروسية، لابد أن نتعرف العوامل العوامل التى تؤثر على بقاء الفيروس واحتفاظه بخصائصه؛ فحتى يتمكن الفيروس من البقاء لابد من توافر العوائل المناسبة التى يتكاثر فيها. وكذلك لابد أن تتوافر له وسيلة فعالة للانتقال والعدوى، وكذا لابد أن يتوافر له احتياطى مناسب من العوائل الأخرى، التى يمكن أن ينتقل منها وإليها.

كما أن العامل المحدد لوجود وانتشار فيروس معين فى مكان محدد أو حتى على مستوى العالم يأتى محصلة لمجموعة من العوامل الطبيعية والبيولوجية.

وفى هذه الحالة سندرس أهم هذه العوامل باختصار، مظهرين بوضوح أكثر الوسائل التى يؤثر أى عامل منها على العامل أو العوامل الأخرى، وبالتالى تؤثر على انتشار الفيروس وبقائه. من المعلوم أن فهم إيكولوجيا المرض الفيروسى «العوامل البيئية» فى محصول محدد، وفى مكان محدد أمر مهم، بالنسبة لاستنباط الوسائل الفعالة لمقاومة هذا الفيروس واتقاء الأضرار المتسببة عنه.

والفيروس كغيره من الطفيليات الإجبارية، فإن العوامل البيئية العامة التى يجب دراستها تنحصر أساسا فى طرق انتقال الفيروس من نبات لآخر، وكذا الطرق الأخرى التى تتمكن بها العوامل الأخرى من التأثير على انتشار الفيروسات.

وتنحصر هذه العوامل فى :

أولا : العوامل البيولوجية :

١ ـ خصائص الفيروس والنبات العائل:

أ ـ ثبات الفيروس وتركيزه فى النبات :

فى أغلب الأحوال، فإنه فى الظروف المتشابهة، فإن الفيروس الثابت يكون ثابتًا سواء كان داخل أو خارج العائل، ويصل فى أنسجة العائل إلى تركيزات عالية؛ مما يعطيه فرصة أكبر

فى البقاء والانتشار أكثر من الفيروس، الذى لا يملك مثل تلك الصفات. فمن الواضح أن بقاء الفيروس وقدرته على الانتشار تتوقف لحد كبير على درجة ثبات الفيروس وكميته أو تركيزه، الذى يصل إليه عن طريق التزايد العددى فى انسجة العائل. فعلى سببيل المثال فإن فيروس TMV يمكنه أن يحتفظ بخصائصه الحيوية لفترات طويلة فى الأنسجة الميتة أو بقايا العائل فى التربة، التى تصبح فى هذه الحالة مصدراً للعدوى للمحاصيل التالية.

ب ـ سرعة تحرك الفيروس وانتشاره فى انسجة العائل:

إن الفيروسات أو السلالات التى تتحرك ببطء من مناطق العدوى إلى أنسجة النبات الاخرى تكون فرصتها فى البقاء ضئيلة، وبالتالى تقل فرصتها فى الانتشار بعكس تلك الفيروسات، التى تتحرك بسرعة من مراكز العدوى. كما أن سرعة انتقال الفيروس من مناطق العدوى تلعب دوراً مؤثراً ومهمًا، بالنظر اليها من ناحية فترة استمرار حياة النبات العائل.

إن الفيروسات التى تصيب النباتات المعمرة، أو التى تعيش طويلاً يمكنها أن تنتشر خلال أنسجة النبات بصورة أبطأ من تلك التى تصيب المحاصيل الحولية. وبعض الفيروسات الثابتة مثل TMV الذى يتجمع فى تركيزات عالية، عندما يصيب عوائله الأساسية مصيبًا كل الأنسجة، فإن له القدرة على الانتقال بواسطة وسائل العدوى الصناعية الميكانيكية.

كما أن الفيروسات التى تصل الى البذور، وتبقى بها تملك خصائص مميزة بالنسبة لغيرها من الفيروسات فيما يتعلق بانتشارها، وكذا امتلاك القدرة على البقاء فترة طويلة.

كما أن فيروس نيكروز الدخان يتحدد انتشاره بوصوله الى المجموع الجذرى للعوائل المختلفة، وكذا يتحدد بقاؤه بوجود الفطريات الحاملة له، والتى تنقله حتى يمكن أن يصيب نباتات أخرى.

جـ ـ درجة العدوى:

إن فرص بقاء الفيروسات سريعة الانتشار فى أنسجة العائل مسببة عدوى جهازية ومؤدية إلى موت النبات، تكون أقل من تلك الفيروسات التى تسبب أمراضًا متوسطة أو شديدة، وتسمح للعائل بالنمو الخضرى والتكاثر.

ومن الممكن أنه يكون موجودا فى الحقل انتخاب طبيعى موجه ضد السلالات القاتلة للنواقل. وقد لوحظ أن الخنافس الموجودة فى غرب الولايات المتحدة تصاب فى البداية بسلالات من فيروس تجعد القمة فى بنجر السكر، التى تحدث أمراضًا خفيفة، وبالتالى تصبح الفرصة أكبر للسلالات الشديدة من ذات الفيروس وتسبب تقزمًا للنباتات، وهذا بدوره يشجع على انتشار وتكاثر الناقل. إلى جانب ذلك فإن انتشار السلالات الشديدة يشجع على الاعتقاد بأن الإصابة بالسلالات الضعيفة لا يمكن أن يحمى العائل من العدوى بالسلالات الشديدة. وتعيش الخنافس بالقرب من حقول بنجر السكر ناقله السلالات الشديدة بصورة أكبر من السلالات الضعيفة المحمولة بداخلها.

د - بقاء الفيرس وانتخاب السلالات:

إن الفيروسات ذات القابلية الكبيرة للتطفير وتكوين السلالات الجديدة تكون لها القدرة على التأقلم والتكيف مع التغيرات التى تحدث فى الوسط المحيط، وبذا يمكنها الاستجابة للوسط الجديد والبقاء والانتشار. ومحاولة إيجاد مقارنة بين الفيروسات من حيث قابليتها للتطفير أمر صعب، ولكنه من الواضح أن الفيروسات تختلف فيما بينها من حيث هذه القابلية فعلى سبيل المثال فإن فيروس التفاف أوراق البطاطس ثابت نسبيًا على أنه من الممكن أن يكون ذلك راجعًا إلى نقص فى التجارب التى أجريت على دراسة هذا الفيروس من هذه الناحية. بينما نجد أن فيروسات أخرى كثيرة مثل التبقع البرونزى فى الطماطم توجد فى الطبيعة فى صورة عدد كبير من السلالات، وتتجمع معلومات كثيرة تؤكد أنها سلالات مختلفة لهذا أو ذاك من الفيروسات. كما توجد معلومات كثيرة تؤكد أن السلالات المختلفة للفيروس يمكن أن تختلف من حيث السيادة، ومن حيث أنه يمكنها إنتاج طفرة محددة أخرى. وعلى سبيل المثال فإن السلالات الضعيفة من فيروس x البطاطس المعزولة من البطاطس، من الممكن أن تعطى بداية لسلالات تسبب التبقع الحلقى فى الدخان، ولكن لم يحدث أن لوحظت هذه الصفة فى أى من السلالات التى تسبب مظهر التبقع الحلقى المعزولة بداية من الطماطم.

كما يلاحظ أن إحدى سلالات فيروس TMV، وهى سلالة aucuba تكون مجموعة

محدودة من الطفرات تختلف فيما بينهما من حيث الأعراض التى تسببها، فى حين أن السلالة العادية لفيروس TMV يمكن أن تعطى دائرة واسعة من الطفرات من طراز مختلف تمامًا.

وفى الحقل.. فإن السلالات المختلفة لفيروس TMV يمكنها أن تصيب أنواعًا وأصنافًا مختلفة من الدخان، ومن الممكن أن يكون العامل الأساسى فى ذلك، هو أن هذه أو تلك من السلالات التى تصبح سائدة فى عائل معين، تملك سرعة التحرك فى أنسجة العائل، وبالتالى فإنها تمنع الإصابة بسلالات أخرى.

وفى المناطق التى يزرع بها المحاصيل الحولية مثل الدخان على مدى عدد كبير من السنين، فمن الممكن أن تسود سلالات مميزة من الفيروس. فلقد أوضح Valloa Ganson أن فى المناطق التى يزرع بها الدخان لعدد كبير من السنين وجد أن المزارع المختلفة تسود بها سلالات مختلفة، أى سلالة متميزة لكل مزرعة من فيروس TMV. وفى المساحات الواسعة فإن العزل الجغرافى يمكن أن يؤدى إلى التفرقة أو عزل السلالات، خصوصًا إذا ما كانت الظروف المناخية مختلفة، فعلى سبيل المثال ففى البلاد التى تتمتع بصيف حار، من الممكن أن يفقد الفيروس حتى داخل الأنسجة الحية فى الظروف الطبيعية، ومثال ذلك أنه فى بعض مناطق الهند فإن درنات البطاطس التى تخزن فى المخازن العادية، من الممكن أن تشفى من فيروس التفاف الأوراق، بينما الدرنات التى تخزن فى الثلاجات تظل حاملة للفيروس، وكذا الحال بالنسبة لنباتات الشليك التى تزرع فى أمبريال فالى كاليفورنيا؛ حيث تشفى من فيروس تجعد الشليك.

وليس نادراً ما يلاحظ التغيرات الجغرافية التى تسبب سيادة إحدى سلالات فيروس ما، فقد اكتشف زوخوف وآخرون أن هناك اختلافات فى السلالات السائدة من فيروس التقزم الأصفر فى الشعير الذى وجد فى نباتات الشوفان المنزرع بولايتى ألينوى ونيويورك، وهذا الاختلاف ظهر فى الناقلات الرئيسية «المن»، ومدى ظهور الأعراض أو شدة المرض، ومع ذلك فإنه ليس هناك ما يدعو إلى الاعتقاد ان هذا الوضع غير قابل للتغيير؛ حيث أثبت زوخوف أن السلالات السائدة على الشعير فى ولاية نيويورك قد تغيرت.

كما أن العمليات الزراعية من الممكن أن تلعب دوراً ما بطريقة أو بأخرى فى انتخاب السلالات الفيروسية، التى تصبح سائدة بالنسبة لهذا أو ذاك من المحاصيل، فعلى سبيل المثال فى إحدى الولايات التى تزرع صنف البطاطس أران Arran أدت أساليب الزراعة وانتخاب هذا الصنف الى تغير سلالة فيروس X البطاطس، التى كانت تصيب هذا الصنف. مظهرة أعراض التبرقش. ولقد أدى اقتلاع النباتات التى تظهر عليها أعراض التبرقش الى سيادة السلالات الكامنة أى التى لاتظهر أعراضًا، ولكن أحيانا يظهر انتشار غير متوقع لهذه السلالات الكامنة، مظهرة أعراضًا شديدة مما يؤدى الى الاعتقاد بوجود علاقة غير ثابتة بين الفيروس والعائل.

واذا ما استخدمت سلالة عديمة الأعراض من فيروس X فى عدوى نبات بطاطس سليم، فإنه لا ينتظر ظهور أعراض فى السنة نفسها، بينما يأخذ الوضع فى السنة التالية صورة أخرى.

وفى الحالات التى تشكل فيها الحشائش المعمرة ونباتات الزينة مصدراً، تنتقل منه العدوى الفيروسية إلى أحد محاصيل الحقل الحولية، فإذا ما تغير هذا المحصول بمحصول آخر فإنه من الممكن أن يصاب بسلالات من هذا الفيروس، التى لم تكن تصيبه من قبل.

وإذا كانت العمليات الزراعية لبعض المحاصيل وغيرها من العوامل، تتم لوقت طويل فى منطقة ما دون تغير، فمن الممكن أن تنتظر أن العلاقة الثابتة بين المحصول والظروف المحيطة تؤدى إلى انتخاب السلالات، الذى يستمر حتى الوصول الى السلالة السائدة؛ أى السلالة المتاقلمة مع ظروف الوسط والمحصول .

ومن هنا نرى أن العوامل الأساسية فى ظهور السلالات هى ما يلى:

١ ـ الانتقال النشط بالحشرات أو بعوامل أخرى.

٢ ـ التزايد العددى السريع وكذا سرعة التحرك فى أنسجة العائل.

٣ ـ ظهور الأشكال المرضية الضعيفة والشديدة.

هـ - مدى المجال العوائلى:

عند دراسة توزيع الفيروسات حسب الوحدات التقسيمية للمملكة النباتية، نجد أن أقدم المجموعات النباتية وأقلها تطوراً لا تصاب إلا بعدد قليل من الفيروسات، وقد أيد ذلك عدد من البحوث، ويعتقد أن أحد أسباب ذلك أن النظائر الحية لحفريات هذه النباتات القديمة مازالت موجودة، ومن الممكن أن تكون هذه النباتات قد اكتسبت نوعًا من المناعة أو المقاومة لمختلف الكائنات الدقيقة الممرضة والحشرات، وأيضا الفيروسات، وعلى سبيل المثال.. فإن شجرة Ginkgo biboba التى تنتمى إلى عاريات البذور توجد منذ ٢٠٠ مليون سنة، وتملك مقاومة عجيبة ضد الإصابة بالفطريات. وقد وجد أن العصير المستخلص من هذه الشجرة يحتوى على مواد مثبطة لنمو الفطريات، وكذا مثبطة لبعض الفيروسات، **وفيما يلى موجز لتوزيع الفيروسات على المجموعات الدنيئة من المملكة النباتية:**

أولا : الطحالب:

إلى جانب بعض الفيروسات التى تصيب الطحالب الزرقاء المخضرة لم يعرف حتى الآن فيروسات تصيب بقية هذه المجموعة من النباتات، إلا أنه فى الآونة الأخيرة، وعلى أساس الدراسات المتقدمة البيوكيميائية ودراسة التراكيب المتناهية الدقة لبعض الطحالب الزرقاء المخضرة، أثبت أن هذه الطحالب قريبة الشبه جداً بالبكتريا، أكثر من قربها لبقية أقسام الطحالب، ولذا فقد أتضح أن فيروسات الطحالب الزرقاء المخضرة تشبه البكتريوفاج من حيث أن لها رأسًا سداسيًا وذنبًا.

ثانيا : الفطريات:

لقد تمكن Hollings سنة ١٩٦٥ من أن يستخلص من فطر ***Agarlcus bisporus*** مستحضراً يحتوى على جسيمات شبيهة بالفيروسات فى ثلاثة طرز، وأوضح أنه عن طريق حقن هذه الجسيمات فى الحامل الجرثومى، فإن هذه الجسيمات تسبب أمراضاً. فالفيروس رقم ١ عبارة عن جسيمات عديدة الأضلاع قطرها ٢٥ مليميكرون، بينما جسيمات الفيروس رقم ٢ تشبه رقم ١ إلا أن قطرها ٢٩ مليميكرون، أما الفيروس رقم ٣ فقد ظهر

عصويًا ٥٠X١٩ مليميكرون يشبه إلى حد كبير فيروس موزايك البرسيم. وقد استخدم المؤلف مستخلص الفطريات المربعة كلقاح، ثم دعك أوراق بعض النباتات مغطاة البذور، ومنها عوائل فيروس موزايك البرسيم، ولكن لم تظهر لدى أى منها أى مظاهر مرضية. وعند دراسته لكيفية إصابة بعض الحوامل الجرثومية للفطر المذكور، فلقد ظهر فى الأطباق التى ينمو فيها الفطر مناطق مميزة حول مراكز العدوى، وإلى جانب مراكز العدوى توجد منطقة مركزية لا ينمو بها الفطر، اللهم إلا بعض الهيفات المشوهة بينما المنطقة التى تحيط بالمنطقة المركزية تحتوى على عدد كبير من الأجسام الثمرية غير الكاملة النمو، والتى تتحلل مبكرا. والى الخارج من هذه المنطقة تبدو جميع الفطريات، كما لو كانت سليمة ويظهر المرض لدى عدد قليل منها.

وحتى الآن لم تعرف العلاقة بين هذه الطرز الثلاث من الفيروسات وإحداث المرض، ثم تمكن Hollings من ابتكار طريقة سهلة لاستخلاص الفيروس من عدد قليل من الهيفات الفطرية، مستخدمًا الموجات فوق الصوتية، وهنا أمكن استخلاص فيروس ١، وفصل الباقى إما مفردة أو مختلطة، بينما وجد الفيروس الثالث مختلطا مع الجزيئات ذات الشكل عديد الأضلاع.

وقد تمكن Klienschmidt سنة ١٩٦٢ من استخلاص مادة ما من راشح مزرعة *Penicillium Stdiniperum* (سلالة ATCC - 14586)، وهذه المادة لعبت دوراً مثبطًا للفيروسات التى تصيب الحيوانات أو مزارع الأنسجة، وقد أطلق على هذه المادة اسم Statalon واعتبروها من السكريات العديدة، حيث تنشط تكون الانترفيرون «مضادات الفيروس».

إلا أن Klienschmidt و Ellis تمكنا من العثور على جزيئات شبيهة بالفيروسات من مستحضرات الـ Statalon وكذا فى ميسيليوم الفطر المذكور، واستخلصا من ذلك فكرة تتلخص فى أن الأثر المنشط لمستحضر Statalon فى تكوين انترفيرون يرجع أساسًا إلى وجود الفيروس.

ثم تمكن Banks وآخرون من الحصول على نتائج مؤكدة، حينما تحصلا على كمية كافية

من الجسيمات الفيروسية العصوية ذات المقاييس ٢٥ - ٣٠ ملليميكرون من مزرعة الفطر المذكور، وتوصلا الى أن كفاءة المستحضر Statalon المضاد للفيروس ترجع الى وجود RNA الفيروس، الذى يشجع تكون الأنترفيرون عند الفئران. كما أمكن عن طريق معاملة جراثيم السلالة المذكورة بالحرارة ظهور سلالة جديدة من الفطر لا تملك الفيرس.

كما توجد معلومات أخرى عن إمكانية انتقال العدوى للفطريات، التى قد تعرف فيما بعد بمزيد من الدراسات على أنها فيروسات. فعلى سبيل المثال ذكر Liydenburg سنة ١٩٥٩ أن فطر *Helminthosporium Victoriae* يصاب بمرض يمكن أن ينقل إليه ميكانيكيًا؛ فعدوى مزارع هذا الفطر النامية على الآجار لم تؤد إلى موتها، ولكن ظهر على حواف المزرعة توقف نمو الفطر، وظهر بنسيليوم هوائى، أو تحلل، وحينما وضعت على طبقة الآجار نفسها هيفات مصابة، وأخرى سليمة على بعد ١ سم بين الواحدة والأخرى، فقد لوحظ أن نمو العزلة السليمة قد تهدم بعد ساعات قليلة من الاتصال بالعزلة المصابة، وقد اعتقد وقتئذ أن هذا التأثير يرجع إلى وجود توكسين معين، ولكن عندما أخذت هيفات من العزلة التى كانت سليمة وأعيدت زراعتها، ظهرت إصابتها بالمرض مما يدل على وجود مسبب مرضى «فيروسى» وليس توكسينًا. ولاتحدث العدوى إلا عندما تتلامس الهيفات المصابة والسليمة، ولكنها لم تحدث عند غمر الهيفات السليمة فى مستخلص الهيفات المصابة.

كما تعرف حالة أيضا فى فطر الأسبيرجلس تسمى بحالة الموت الخضرى تعرف عليها Jinks سنة ١٩٥٩ فى فطر *A.glaucus* وأطلق عليها Lethal suppressive cytoplasma. فعندما يزرع هذا الفطر بطريقة hyphal tip من مزرعة قديمة، فإن كثافة النمو تقل ثم تظهر مناطق معينة على الهيفات، وعندما يتم التكاثر الجنس بين السليم والمصاب فإن جميع الناتج يكون مصابًا بهذه الظاهرة.

ثالثا: الحزازيات:

لم تعرف فيروسات تصيب الحزازيات بعد.

رابعاً : التيريديات :

لم يكتب فى ذلك سوى Hull عن أنه وجد فى منطقتين فى إنجلترا فيروساً يصيب نبات *Phyllitis Scolopendrium*، وغيره من السرخسيات .

خامساً: معراة البذور:

يعرف عدد من الفيروسات التى تصيب النباتات مغطاة البذور، يمكنها أيضاً أن تصيب معراة البذور، ففى الطبيعة يلاحظ لدى أفراد هذا القسم أمراض تشبه الأمراض الفيروسية، والتى يعتقد أن مسبباتها تنتمى الى الفيروسات، وقد أثبت Yarwood أن جذور نبات *pinus sylvestris* تصاب بالعدوى الميكانيكية الصناعية بفيروس نيكروزيس الدخان TNV، كما أن النيماتودا يمكن أن تنقل فيروسات من مجموعة الموزايك إلى نوعين من أنواع الصنوبريات، وقد وجد (Hartriso) أن نيماتودا *X.diversicadatum* يمكن أن تنقل فيروس موزايك الأرابيس إلى جذور *Chamascyparis lowsoniana*، ويبدو أن هذا الفيروس يصيب الجذور فقط، ولم يمكن عزله من الجذوع والأوراق، وفى تجارب مشابهة تمكنت نيماتودا من جنس *Longidorus*، من نقل فيروس TBRS الذى يسبب التبقع الحلقى الأسود فى الطماطم إلى جذور نباتات *Picea stichensts* .

وفيما يتعلق بانتشار فيروسات معراة البذور فى الطبيعة، فهناك كتابات عن أمراض Picea evcelsa حيث يظهر المرض على القلف، فى صورة اصفرار مخضر، أو اصفرار يميل إلى البياض، ثم يختفى فى المراحل المتأخرة، ولكن يتأخر نمو النبات، وتصبح الأشواك أكثر قصرا وتنمو دون انتظام، كما أن Bino Popovitch ذكر مرضاً يصيب *Pinus nigra*، تنحصر أعراضه فى تشوه الأوراق البرية، كما تظهر أعراض التبرقش، ويعتقد الباحثان أن هذا المرض يتسبب عن فيروس.

مما سبق يتضح دور الفيروس فى إصابة مختلف أقسام المملكة النباتية، أما هنا فيهمنا أن ندرس العوامل التى تربط بين حيوية الفيروس وانتشاره تحت الظروف الحقلية بالمدى العوائلى من بين النباتات.

ومن الواضح أن الفيروسات تختلف فيما بينها اختلافًا كبيراً من حيث المجال العوائلى الذى تصيبه. فعلى سبيل المثال فإن الفيروسات التى تصيب الشليك يكون مجالها العوائلى محدوداً بجنس Fragaria، بينما نجد أن فيروسات أخرى يمكنها أن تصيب مجالاً واسعًا من النباتات، وعلى سبيل المثال فإن فيروس التبقع البرونزى فى الطماطم يتميز باتساع مجاله العوائلى، حيث تصيب نباتات تتبع ذوات الفلقة الواحدة، وأخرى تتبع ذوات الفلقتين، ومن المعروف أن هذا الفيروس يصيب نباتات ١٦٦ نوعًا تتبع ٣٤ عائلة نباتية، ويقع الجانب الاعظم من النباتات الحساسة لهذا الفيروس فى العائلتين الصليبية والمركبة.

الفيروسات ذات المجال العوائلى الضيق تبقى لأن عوائلها فى أغلب الأحوال تكون معمرة وتتكاثر خضريا، وإن تكاثرت بالبذور، ففى الغالب فإن هذه الفيروسات تنتقل خلال البذور.

فيروس الاصفرار النيكروزى الذى يصيب خس اللاتوكا فى أستراليا يبقى فى الطبيعة على حساب عوائل، تتبع جنس Sonchus فقط، وعند زراعة خس اللاتوكا، أصبح هذا الفيروس فى السنوات الاخيرة يشكل خطراً عليه، ويعتقد Stubs أن هذا يرجع الى النقص الكبير الذى حدث فى الأرانب البرية، التى كانت تتغذى على عوائل هذا الفيروس؛ مما شجع هذه العوائل على النمو، وبالتالى أصبحت مخازن للفيروس، الذى أصبح يهدد زراعات الخس فى أستراليا.

إن المجال العوائلى الواسع يعطى للفيروس فرصاً أكبر للبقاء وللانتشار الواسع؛ حيث إن مثل هذه الفيروسات تصيب النباتات المعمرة والمحاصيل الحقلية الحولية، وبذا يمكنها أن تنتشر فى جميع أنحاء الكرة الأرضية، **وتعتبر الفيروسات التالية من الأمثلة الرئيسية على ذلك:**

١ - فيروس التبرقش الأصفر فى الفاصوليا - فيروس تبرقش الخيار حيث يعتبر الجلاديولس أكبر مخزن لهما.

٢ - فيروس التبقع البرونزى فى الطماطم الذى يخزن فى الداليا، أو فى جنس Georgina

التى تصاب أيضاً بفيروس تبرقش الخيار، ولكن دون ظهور أعراض.

٣ ـ فيروس تبرقش الخيار الذى يخزن فى نبات الزينة الزنبق Lily، ولكن دون أن يؤثر على العائل.

إن أغلب النيماتودا والفيروسات التى تنتقل بواسطتها، يتمتعان بمجال عوائلى واسع للغاية، يضم نباتات معمرة وأخرى حولية، حتى ولو لم يوجد العائل المناسب فإنهما يبقيان على البقايا الخشبية الموجودة بالأرض، أو البقايا مما يحقق بقاءهما.

انتشار الناقلات:

من المعروف فى علم الفيروسات النباتية أن الناقلات الحشرية والفطرية، تعتبر من ناقلات الفيروس المهمة. **ومن وجهة النظر الإيكولوجية، يفضل توجيه الحديث إلى مجموعتين من هذه الناقلات، وهما:**

١ ـ ناقلات فيروسية خلال التربة «من جذور نبات مصاب الى جذور نباتات سليمة».

٢ ـ ناقلات فيروسية خلال الوسط الهوائى.

وهنا يجب أن تتناول الدراسة انتشار الفيروسات فى مساحات واسعة، وإلى مسافات بعيدة المدى. وهنا يلعب الإنسان دوراً مهما إلى جانب نقله الميكانيكى ونشره للفيروسات فى حدود حقله.

أولا: انتشار الفيروسات خلال الوسط الهوائى:

إذا ما قيّمنا الفيروسات النباتية، فإنه يمكن القول أن العامل الرئيسى بلا أدنى شك فى نشر الفيروسات، وبالتالى فى حفظ بقائها، هو الحشرات الماصة لعصير النباتات، وعلى وجه الخصوص حشرات المن. **وهنا طريقة نشر الفيروسات وسرعة، ومدى الانتشار يتوقف على عدة عوامل، نذكر منها ما يلى:**

١ ـ مصدر اللقاح المعدى: يمكن للجوهر المعدى أن ينتقل من خارج المزرعة أو المحصول أو من النباتات المصابة الى السليمة فى الحقل نفسه. وقد يكون مصدر تلك النباتات

المصابة هو البذرة المصابة، إذا كان المحصول يتكاثر بالبذور الحقيقية، أو عن طريق الأجزاء الخضرية إذا كان يتكاثر خضريًا ، وإما أن يكون مصدره الحشائش وغيرها من النباتات التي قد تتواجد مع المحصول.

٢ ـ الجرعة الفعالة من اللقاح المعدى.

٣ ـ طبيعة وطريقة حياة الناقل فعلى سبيل المثال فيما يتعلق بالمن من العوامل المهمة، ما إذا كان هذا المن مجنحًا أم لا.

٤ ـ العلاقة البيولوجية بين الفيروس والناقل الحشرى، فكما سبق أن عرضنا فهو إما أن ينتقل عن طريق أجزاء الفم، أو أن يكون مارًا أو متكاثراً داخل الحشرة.

٥ ـ الوقت الذى يصبح فيه الناقل نشطا وفعالا فى النقل، ومواءمة ذلك مع مواعيد زراعة هذا أو ذاك من المحاصيل.

٦ ـ الظروف الحيوية أو المناخية.

وفى واحد من البحوث الأولى، حيث تم تقييم علاقة انتشار الفيروس بكمية المن وأعداده، قدرت أعداد المن على النبات فى أوقات مختلفة على مدى موسم النمو الخضرى للنبات، وغالبًا ما كانت العلاقة بين أعداد المن ونسبة انتشار الفيروس غير واضحة على وجه الدقة.

إلا أن Gregory & Doncesrter سنة ١٩٤٨ توصلا إلى خلاصة مهمة، وهى أن الأهمية ترجع الى المن المجنح، والذى يهاجر متنقلاً بين النباتات فى مساحات منزرعة بمحصول معين فى بداية موسم النمو الخضرى. بينما تتوقف أعداد المن الساكن «غير المجنح» على النباتات إلى حد كبير على الظروف الجوية. والظروف الأخرى المحيطة بزراعة هذا المحصول أو ذاك. إن أعداد المن يمكن أن تتضاعف عشر مرات خلال أسبوع واحد، وحتى فى المساحات الصغيرة فإن أعداد المن عمومًا تختلف من نبات لآخر. وفى البحوث التالية توصل الباحثان الى حقيقة أن المن المهاجر فى بداية موسم النمو الخضرى من أهم العوامل فى نشر الفيروسات.

قام Broadbent & Eaicthcote سنة ١٩٦١ بزراعة درنات البطاطس السابق إنباتها فى

قصارى، ثم قاما بوضع هذه القصارى فى الحقل على مسافات محددة، وفى مواعيد محددة خلال موسم النمو الخضرى، قاما بعدوى هذه النباتات «التى فى القصارى» بفيروسات التفاف الأوراق أو بفيروس Y البطاطس، ثم قاما بدراسة أعداد المن وكميته، ثم حددا النباتات التى أصيبت خلال الحقل. ووجدا أن هذه الفيروسات انتقلت فى بداية موسم النمو الخضرى، حينما كانت أعداد المن ضئيلة، ولم يمكن الانتقال فى وسط الموسم حينما كانت أعداد المن كبيرة، ومن الممكن جمع المن المجنح المتجمع على محصول ما، ثم اختباره على عوائل أخرى، سواء من المحصول نفسه، أو من غيره لمعرفة ما إذا كانت هذه الحشرات حاملة لفيروس ما أم لا.

كما أن طبيعة انتقال «انتشار» الفيروسات تختلف من فيروس لآخر فى حدود واسعة، حتى بين تلك الفيروسات التى تصيب المحصول نفسه، والتى تنتقل بأنواع الناقلات نفسها، أو بأنواع مختلفة منها فى الحقل نفسه؛ حيث فى الموسم التالى تتضح طبيعة انتشار كل من فيروس التفاف الاوراق وY البطاطس، فإذا ما جاء الفيروس الى المزرعة من الخارج بواسطة الناقلات، فليس من الضرورى أن ينتشر من مصدر داخل الحقل نفسه. ويمكن ملاحظة أن انتشار الفيروس داخل حقل معين انتشاراً غير ملحوظ أو غير كبير. وهذا يحدث إذا تم الانتقال فى نهاية موسم النمو الخضرى، أو يرجع ذلك إلى ان الناقل سريع الهجرة أو سريع الحركة.

وعلى سبيل المثال كما سبق أن ذكرنا حيث يتضح من حقلين : أحدهما كان خالياً منذ البداية من الإصابة بفيروس Y البطاطس، وكان مصدر الإصابة على مسافة عدة مئات من الأمتار يلاحظ أن توزيع النباتات التى أصيبت فى الحقل كانت دون انتظام أى عشوائية.

وعندما وضع فى منتصف الحقل فى بداية موسم النمو نبات بطاطس واحد مصاب بفيروس التفاف الاوراق، وحتى تنتقل الإصابة من نبات لآخر فى الحقل نفسه؛ فقد لوحظ هنا أن النباتات التى أصيبت تتجمع حول مصدر الإصابة. وعلى هذا الأساس يمكن

التعرف عما إذا كانت الإصابة ذات مصدر داخلى فى الحقل أو خارجى بعيداً عنه.

وقد ابتكر Van der plank سنة ١٩٤٦ طريقة يمكن بواسطتها تحديد ما إذا كان الفيروس ينتقل من نبات مصاب فى حدود الحقل أم من خارجه . وقد أسس طريقته على أن الفيروس الوارد من خارج الحقل يكون موزعًا دون انتظام، كما سبق أن ذكرنا، ومن هنا **استنتج أن هناك احتمالات لفرصة وقوع نباتين متتاليين مصابين (أى زوج) وعبر عن ذلك بالمعادلة التالية:**

$$P = X \frac{(X-1)}{N}$$

حيث إن P = عدد الأزواج.

N = عدد النباتات المفحوصة فى خط واحد.

X = عدد الأزواج المصابة.

وفى حالة القيم الكبيرة لـ N فإن الخطأ يكون فى P $\sqrt{P}$ فإذا وجد أن عدد أزواج النباتات المصابة (ثلاثة نباتات متجاورة تعتبر زوجية) تعتبر أكبر من المتوقع، فإن من الممكن أن تعتبر أن الفيروس ينتشر داخل الحقل من مصدر داخلى فيه؛ أى من نبات مصاب داخل الحقل نفسه. ومع ذلك فليس من الضرورى إذا كان المصدر داخليًّا أن تصاب النباتات المتجاورة باستمرار، إلا أنه لا يمكن استبعاد هذا الاحتمال . وفى حالة ما إذا كان الفيروس ينتقل خلال الحقل بواسطة نوعين مختلفين من الناقلات، فإن التعرف على نوع الإصابة التى تحدث فى الحقل يكون غير واضح؛ حيث إن الناقل الأول يمكن أن يصيب النباتات المتجاورة، فى حين أن الثانى يمكن أن يصيب نباتات متفرقة على مسافات بينها وبين بعضها.

وفى حالة الفيروسات التى تحمل على أجزاء فم الحشرة، تلعب الحشرات التى لا تكون مستقرة على النباتات الدور المهم، حيث يمكنها التحرك من نبات لآخر، على الرغم من أنها قد تشكل جزءاً ضئيلاً من مستعمرات المن؛ أى إن المن المجنح يمثل أفراداً قليلة من

المستعمرة.

كما أن المن المجنح له القدرة أيضًا على جلب الفيروس من الخارج، بالإضافة الى إمكان نشر الفيروس من نبات داخل الحقل نفسه؛ حيث إنها تتحرك فى حدود ظروف غذائية مناسبة. كما سبق أن ذكرنا فإن طريقة انتشار الفيروس على محصول ما فى حدود حقل ما يتوقف الى حد كبير على طبيعة حياة الناقل، وخصوصاً المن، فعلى سبيل المثال نجد أن بق الصليبيات يختلف فى طبيعة تحركه داخل المحصول عن المن اختلافًا كبيراً، ولذا نجد أن الأولى تكون أكثر نشاطًا فى نقل الفيروس؛ لأنها تتحرك من نبات لآخر فى مسافات قصيرة، ولكنها تفعل ذلك كثيراً أى تأهل عدد كبير من النباتات، أكثر من المن غير المجنح، ومن جانب آخر فإنها لا تصل إلى مسافات بعيدة، كما يفعل المن المجنح.

وكما نرى فإن الجانب الأكبر من العوامل التى ناقشناها يتعلق بالاختلاف فى أعداد النباتات، التى أصيبت بفيروس ما بواسطة حشرات المن. كما أن مدى ظهور الأعراض المرضية من الممكن أن يزيد وضوحها بزيادة الجرعة الفيروسية فى اللقاح المعدى، والذى يمكن أن يتحقق بواسطة تغذية عدد كبير من المن على النبات، كما أن المرض من الممكن أن يظهر أشد وضوحاً إذا ما أصيبت النباتات فى عمر مبكر.

ثانيا: الانتشار خلال التربة:

توجد ثلاث مجموعات من الفيروسات التى تنتقل عن طريق التربة:

١ - فيروسات لم يعرف لها ناقل.

٢ - فيروسات تنتقل بواسطة الفطريات.

٣ - فيروسات تنتقل بواسطة النيماتودا.

ومن المعروف أن فيروس تبرقش أوراق الدخان TMV يعتبر من الفيروسات، التى يمكن أن تنتقل عن طريق التربة بلا مساعدة من أى ناقل؛ حيث إن ثبات هذا الفيروس يسمح له أن يظل نشطاً فى البقايا النباتية من موسم إلى موسم الزراعة التالى، وهناك إذا كانت

الظروف مواتية فإن العدوى تحدث عند زراعة الأصناف القابلة للإصابة فى الأراضى الملوثة، وتتم العدوى عن طريق جروح دقيقة تحدث فى جذور النباتات عند زراعتها، أو من جراء العمليات الزراعية المختلفة.

وينتقل فيروس تضخم العروق فى الخس عن طريق التربة، بواسطة فطر ***Olpidium***، وهو فيروس مداه العوائلى ضيق للغاية، وعلى ذلك يمكنه أن يعيش فترات طويلة فى التربة إذا لم تكن الظروف مواتية؛ حيث يظل فى الجراثيم الساكنة لهذا الفطر. كما أن هذا الفيروس له القدرة على البقاء عدة سنوات فى التربة الجافة، دون أن يصل للنبات المناسب، ومن جانب آخر فإن فيروس TNV الذى ينتقل أيضاً بواسطة فطر ***Olpidium*** يملك مجالا عوائليًّا واسعًا للغاية، ولكن لكى يبقى لابد له باستمرار من وجود جذور النباتات الحساسة، وكذلك الناقل حيث يحمل على سطح الجراثيم الزيجية.

ودون شك، فإن أهم مجموعات الفيروسات التى تنتقل عن طريق التربة، هى تلك المجموعة التى تنتقل بواسطة النيماتودا؛ حيث إن إيكولوجيا هذه المجموعة يختلف عن إيكولوجيا بقية المجموعات، وعن تلك التى تنتقل بواسطة المن.

إن النيماتودات تعيش طويلا ولها مجال عوائلى واسع للغاية، ويمكنها مقاومة الظروف البيئية غير المناسبة لفترات طويلة، وفى غياب العوائل المناسبة؛ فلقد وجد Harrison Hooper سنة ١٩٦٣ أن نيماتودا ***Longidorus elongatus*** يمكنها أن تعيش لمدة سنتين فى تربة رطبة فى غياب العائل المناسب عند درجة حرارة الغرفة، ويمكن أن يظل الفيروس فى جسم النيماتودات التى لا تتغذى لعدة أسابيع أو شهور.

ولا تملك النيماتودا أشكالاً كامنة، ولكنها لها القدرة على الهجرة إذا كانت ظروف التربة غير مناسبة، فعندما تجف الطبقة السطحية من التربة فى الصيف أو تتجمد فى الشتاء، فإن النيماتودا تهاجر الى الطبقات السفلى، وتعود الى الطبقات السطحية، إذا ما تحسنت الظروف، ويكون انتشار النيماتودا محدوداً أو بطيئًا فى التربة غير المعدة، فقد وجد Harrison & Wilson ان أعداد نيماتودا ***X. diversicaudatum*** تنتشر فى الأراضى سيئة

الإعداد، وخاصة المشغولة بالغابات بمعدل ٣٠ سم فى السنة، بينما تزيد سرعة النيماتودا فى الأراضى المجهزة التى تزرع، وكذلك فى الأراضى التى تروى. وقد لوحظ أن طبيعة العدوى التى تحدث عند إصابة محصول ما تتوقف إلى حد كبير على الناقل وحالة الفيروس فى التربة قبل زراعة لهذا المحصول. والرسم التالى يوضح انتشار النيماتودا وفيروس موزيك الأرابيس Arabis Mosaic.v على محصول الشليك بالنسبة لنبات *Prunus Spinosa*، الذى يعتبر مصدراً لكل من الفيروس والناقل.

١ ـ النبات الذى يعتبر مصدراً للإصابة بالفيروس والناقل.

٢ ـ أشجار العائل Prunus الحية.

A = المنطقة التى تنتشر بها النباتات المصابة.

O = الدائرة التى بها رقم تعبر عن أعداد النيماتودا فى ٢٥٠ جرام تربة، موضوعة فى ثلاث قصارى.

ويلاحظ أن المساحة التى تشغلها نباتات الشليك المصابة يتطابق مع المساحة، التى تحتوى على جذور العائل المشترك . وعند زراعة المحاصيل ذات الحولين أو المعمرة فى الحقول المصابة أصلا بالنيماتودا والحاملة للفيروس، فإن المرض يمكن أن يحدث قبل ظهور الأعراض الأولى بمدة سنة أو سنتين، أى إن الأعراض من الممكن أن تختفى لمدة عام بعد حدوث العدوى.

الانتشار إلى مسافات بعيدة المدى:

إن انتشار الفيروسات إلى مسافات بعيدة فى أغلب الأحوال يحدث بطريقة طبيعية، وقد لوحظ فى الدول الاسكندنافية انتشار وبائى لمرض اصفرار بنجر السكر Sugar beet Yel-lows، والذى ظهر أنه كان نتيجة لدخول المن المجنح على نطاق واسع فى يوليو سنة ١٩٥٩ القادم من القارة الأوروبية مع الرياح الجنوبية، التى تراوحت سرعتها من ٥ ـ ١٠ أمتار فى الثانية، وقد حملت هذه الحشرات معها السلالات الشائعة فى القارة من ذلك الفيروس، وسببت إصابة ١٠٠٪ من النباتات فى السويد. ومع ذلك فمازال من الصعب إثبات انتشار المرض بهذه الطريقة؛ حيث إنه من الصعب التحقق من المكان الذى هاجر منه الناقل واقتفاء

أثره، أو تحديد خط سيره، وأصعب من ذلك إثبات أن الحشرات قد نقلت معها فيروساً معيناً بالذات. وقد أثبتت الدراسات أن الفيروسات الدوارة بالحشرة، وكذلك الفيروسات الباقية بالحشرة يمكنها أن تبقى بالحشرة لفترة تكفى؛ لكى يتمكن الناقل من نقل المرض. أما الفيروسات غير الباقية فسريعاً ما تفقد من الناقل. وقد وجد أن الفيروس يظل فى الحشرة التى لم تتوقف إطلاقاً أثناء الهجرة حتى مسافة ٦٠كم (Johansan 1967) وإلى وقت قريب، كان فيروس الأصفرار النيكروزى فى الخس Necrotic Yellows of Lettuce كان وجوده فقط فى استراليا. إلا أن «كلاوز» وجد فى نيوزيلندا مرضا على الخس يتسبب بما لا يدع مجالا للشك عن هذا الفيروس أو إحدى سلالاته، وإن كانت هذه المعلومات لم تنشر. ومن الممكن أن يكون هذا الفيروس قد حمل إلى نيوزيلندا بواسطة حشرات المن الحاملة لهذا الفيروس، التى حملتها الرياح من استراليا التى تبعد حوالى ٢٤٠٠ كم.

وقد أوضح Broadbent سنة ١٩٦٥ أن طائر Passen domesticus يصيب تقريبًا حوالى $\frac{١}{٥}$ النباتات السليمة التى تزرع فى خيمة مع نباتات الطماطم السليمة، وكذا المصابة بفيروس TMV، وهنا يثور تساؤل: هل من الممكن نقل فيروسات مثل فيروس TMV إلى مسافات بعيدة بواسطة الطيور، فى حين أن العامل الرئيسى فى انتشارها فى الحقل مازال فى حاجة الى توضيح؟

أما الفيروسات التى تنتقل خلال البذور، فمن الممكن نظريًا أن تنتقل الى مسافات بعيدة بواسطة الطيور، ومع ذلك لم يثبت حتى الآن ناقل واحد لهذه الحالة. أوضح Proctar (١٩٦٨) ان البذور تظل محتفظة بحيويتها فى حوصلة الطيور البحرية لمدة ٣٤ ساعة، وهذه المدة تكفى لنقل هذه البذور لعدة آلاف اليكلومترات. كما أن الطيور التى تتغذى فى مناطق بعيدة عن البحر، من الممكن أن تقذف بالبذور فى مناطق قريبة من السواحل البحرية، ومن ثم يمكن أن تلتقطها الطيور البحرية ثانية. ولذا فإن المؤلف يرى أن مثل هذه البذور يمكن أن تنقل بما تحمله من فيروسات من قارة لأخرى، حيث تبقى لحين توفر الظروف المناسبة، وتنشر ما بها من فيروسات إذا ما توافرت العوائل الأخرى من بين الغطاء النباتى المحلى. وفى خلال المائة سنة الأخيرة انتشرت فيروسات فى جميع أنحاء الكرة

الأرضية، بعد أن كانت محصورة فى مساحات جغرافية محدودة، ودون أدنى شك فإن الإنسان هو المسئول الأول عن ذلك؛ حيث انتقلت الفيروسات مع النبات أو الأجزاء الخضرية أو البذور. ومن الممكن فى بعض الأحيان بواسطة الناقلات الحشرية، فكثير من فيروسات البطاطس قد انتقلت مع هذا المحصول من أمريكا إلى أوروبا. كما أن فيروس موزايك الخس الذى ينتقل عن طريق البذور يلاحظ حاليا حيثما زرع هذا المحصول، كما أن حقيقة أن فيروس T M V يمكن أن يحتفظ بخصائصه فى رماد السجائر، توضح سبب الانتشار الواسع لهذا الفيروس فى جميع أنحاء المعمورة، حيثما زرع الدخان وغيره من عوائل هذا الفيروس.

إلا أن انتشار بعض الفيروسات الأخرى يتطلب توفر الظروف المناسبة لكل من الفيروس والناقل الحشرى المناسب، وكذلك يتطلب وجود العائل المناسب.

ويعتقد Raski & Hewitt (١٩٦٣) أن انتشار فيروس الورق المروحى فى العنب فى جميع أنحاء المعمورة «وناقله النيماتودى» يرجع فى المقام الأول إلى الإنسان.

وقد نشر Bennet (١٩٦٧) نتائج مجمعة تتعلق بمشاكل الانتشار الجغرافى لفيروس تجعد قمة بنجر السكر . Sugar beet curly top v حيث إن هذا الفيروس كان قد سجل سنة ١٩٠٠ فى غرب الولايات المتحدة، وفى هذه المناطق فإنه ينتشر بواسطة نطاط الأوراق *Circulifer tenellus*. وظل لوقت طويل من الزمن يلاحظ هذا المرض فى هذه المناطق، حتى ظهر اعتقاد أن هذا الفيروس محلى وينتقل بناقل محلى. ولا يوجد نظير لهذا الناقل فى نصف الكرة الغربى، إلا أن بعض الأنواع التى تتبع هذا الجنس، قد لوحظت فى حوض البحر الأبيض المتوسط. وفى سنة ١٩٥٨ لوحظ انتشار هذا المرض الواسع فى تركيا، مما دعى إلى الأعتقاد أن هذا الفيروس وناقله دخلا أول الأمر إلى بلاد البحر الأبيض المتوسط، ومن هذه البلاد وصل إلى الولايات المتحدة. وهنا يظهر تساؤل بأى الوسائل استطاع هذا الفيروس وناقله عبور هذه المسافة خصوصا بوسائل المواصلات البدائية، التى كانت معروفة سنة ١٨٩٥.

ويعتقد المؤلف أن وقت انتشار مرض الحمى الصفراء، سافر الناس إلى كاليفورنيا حاملين

معهم أبقارهم، التى كان يعتبر البنجر الغذاء الأساسى لها، ومنه انتقل المرض وناقله الى الولايات المتحدة . وهذا المثال يوضح الصعوبة فى تحديد موطن نشوء الفيروس، وخط سير انتشاره، وإحدى هذه الصعوبات ترجع إلى نقص المعلومات عن الفيروسات التى تنتشر فى جميع أنحاء الكرة الأرضية، وعلى سبيل المثال فمن الممكن أن يكون مرض تجعد قمة بنجر السكر الفيروسى قد تواجدافى تركيا منذ مئات السنين، ولكن لم يعرف بدقة إلا فى سنة ١٩٥٨.

وعلى الرغم من الحجر الزراعى الذى تتبعه معظم الدول، فإن دور الإنسان فى نقل الفيروسات من بلد لآخر مازال مستمرا حتى الآن، وعلى سبيل المثال فإن فيروس Carrot mosaic virus كان معروفًا منذ وقت طويل فى غرب الولايات المتحدة، ثم ظهر سنة ١٩٦٦ فى نيوزيلندة فى أربع مناطق متجاورة، وبعد عام ١٩٦٦ سجل المرض على جميع الزراعات فى منطقة أوكلاند، ونتيجة لنقل النباتات بواسطة التجار انتشر المرض فى مناطق أخرى حيث تزرع الخضر. وحيث إن هذا الفيروس لا ينتقل عن طريق البذور، وله مجال عوائلى ضيق للغاية ينحصر فى نباتات العائلة الخيمية، كما أنه توجد على الأقل ١٠ أنواع من المن، كانت موجودة فى نيوزيلندة من قبل.. فإننا يمكن أن نخمن كيف انتشر هذا الفيروس فى جميع أنحاء نيوزيلنده؛ حيث إنه لابد وأن يكون قد نقل مع البقايا النباتية التى غالبا ما كانت تقذف بها المراكب فى مضيق أوكلاند، والتى غالباً ما يقذف بها إلى الشاطئ بفعل الأمواج، وماتزال بصورة طازجة إلى حد ما، ومن هنا تغذت عليها الحشرات الناقلة، التى كانت موجودة من قبل فى هذه البلاد.

والفيروسات التى تنتقل الى مناطق جديدة، من الممكن أن تجد هناك ظروفاً تسمح بانتشارها الواسع.

ولقد أوضح Stubbs (١٩٦٤) أن فيروس التقزم المخطط فى الجزر carrot motely dwarf V. انتشر انتشاراً واسعاً فى أستراليا؛ حيث توجد كميات كبيرة من المن *Cavariella aegopodii* الذى يعتبر ناقلاً نشطاً لهذا الفيروس على عكس الحال فى كاليفورنيا؛ حيث تكون الظروف غير مناسبة لهذا الناقل، فإن الفيروس ينتشر ببطء. ومن

وجهة نظر انتشار الفيروسات على مستوى العالم، فإن نيوزيلنده تعتبر مثالاً جيداً؛ حيث إنها من الناحية الجغرافية تعتبر منطقة منعزلة، كما أنها تتمتع بتنوع محصولى كبير وزراعة متقدمة، كما أن مستوطنى هذه البلاد قاموا بجلب أنواع جديدة من النباتات الغذائية إلى نيوزيلنده مثل البطاطا والقلقاس *Colocasia esculenta*. وفى غضون الـ ١٥٠ سنة الأخيرة، نقل المهاجرون الأوروبيون كميات كبيرة من محاصيل الحقل والبستان، وكذلك عدداً كبيراً من الحشائش. وقد سجل للآن فى نيوزيلندة أكثر من ٦٨ فيروساً؛ حيث تصيب المحاصيل التى دخلت حديثاً الى البلاد (نيوزيلندة)، وأغلب هذه الفيروسات تعتبر مطابقة لفيروسات موجودة فى مناطق أخرى من العالم، وعلى وجه الخصوص أوروبا وشمال أمريكا، الأمر الذى يجعل من السهل الاعتقاد أنها دخلت مع الدرنات و الأبصال وغيرها من الأجزاء النباتية، فعلى سبيل المثال من هذه الـ٦٨ فيروساً، ١٨ فيروساً تصيب محاصيل الفاكهة التى تتكاثر خضريا، وقد سجلت أول الفيروسات فى نيوزيلندا سنة ١٩٢٩ على البطاطس.

وسائل تنمية ورعاية المحصول :

من العوامل المؤثرة على الأمراض الفيروسية طرق الزراعة والعمليات الزراعية المختلفة فى هذا أو ذاك من المحاصيل، فى هذه أو تلك من المناطق على مدى الفصول الأربعة، ومن المفروض أن العمليات الزراعية المناسبة تقلل من انتشار المرض، وهنا تتدخل عوامل كثيرة، منها :

موعد الزراعة :

وبدراسة العلاقة بين مدى إصابة المحصول بمرض فيروسى وموعد زراعة المحصول على محصول القمح الشتوى، حيث وجد أن نسبة إصابة القمح بفيروس موزيك القمح المخطط تتوقف إلى حد كبير على موعد زراعته، فإذا ما زرع القمح قبل سبتمبر، فإنه يتم تقصير جزئى لفترات النمو الخضرى الشتوى والربيعى والتى تعتبرمصادر للمرض. كما أن درجات الحرارة العالية من الممكن أن تقلل من أعداد المن، التى تعتبر ناقلات للمسببات المرضية الفيروسية، فإذا تأخرت مواعيد الزراعة حتى تنخفض درجة الحرارة، فإن القمح الشتوى من الممكن أن تقل نسبة إصابته.

الدورة الزراعية :

لنوع « الدورة الزراعية تأثير كبير على انتشار الأمراض الفيروسية، وخصوصا تلك الفيروسات التى لها القدرة على البقاء على الحشائش، أو فى بقايا المحصول السابق، وغالباً ما تكون مصابة بالفيروس أو حاملة له، ومن الممكن أن تتكاثر لفترات طويلة. ولقد أوضح Gregory وDancaster أنه للتخلص من نباتات البطاطس المصابة بالفيروس الملوثة للحقول، يتطلب الأمر ٥ – ٦ سنوات، وفى حالة المحاصيل المعمرة فإن كمية أو أعداد النباتات المصابة تزيد بزيادة عمر المزرعة أو البستان.

تجهيز التربة :

إن طرق معاملة وتجهيز التربة لها تأثير ملموس على انتشار وبقاء الفيروسات فى التربة أو فى البقايا النباتية الموجودة بها. كما أن النيماتودات والفطريات تعتبر ناقلات لفيروسات التربة، إذا ما أصبحت التربة مناسبة لها عند التجهيز؛ فمن العوامل التى تؤثر على بقاء البقايا النباتية الحاملة لفيروس TMV هى مستوى التهوية فى التربة، وكذلك درجة الرطوبة بها. فلو كان المحصول السابق هو البطاطس.. فإن تجهيز التربة أثناء التربة الباردة ينقص بدرجة ملحوظة من عدد الدرنات المتبقية بالتربة.

مساحة الحقل :

يتوقف تأثير مساحة الحقل على انتشار الفيروسات إلى حد كبير على مصدر العدوى الأولى، وعلى كثافة الزراعة، فإذا وجد هذا المصدر على حدود الحقل المشغول بمحصول ما، فإنه كما يشير « فان دير بلانك » سوف تؤثر كثافة النباتات فى مساحة معينة؛ أى الزراعة الكثيفة على الحد من انتشار الإصابة الواردة من خارج الحقل، وقد تأكد هذا فى حالة البرسيم وإصابته بفيروس موزايك البرسيم.

كثافة الزراعة وحجم النباتات :

إن الناقلات الحشرية المجنحة التى تنقل الفيروس من خارج حقل تصيب عدداً أكبر من النباتات، إذا ما زرعت النباتات متباعدة عن بعضها، وتقل نسبة الإصابة فى حالة الزراعة

المتقاربة أو الكثيفة. وقد لوحظ زيادة الإصابة بفيروسات اصفرار بنجر السكر وموزايك بنجر السكر، وحتى فيروس موزايك الكرنب، إذا كانت المسافة بين النباتات وبعضها أو بين الخطوط وبعضها كبيرة، كما لوحظت قلة نسبة الإصابة بهذه الأمراض حينما كانت المسافة قليلة.

كما أنه يمكن القول أن النباتات الطويلة النامية فى حقل مشغول بهذا أو ذاك من المحاصيل تكون فرصتها فى تلقى الإصابة أو العدوى أكبر من النباتات القصيرة؛ خصوصاً تلك الفيروسات التى تنتقل بواسطة حشرات المن؛ حيث إن فرصة زيارة الحشرات لهذه النباتات الطويلة أكبر، وقد لاحظ Broadbent ذلك فى حقول الكرنب على مدى موسم واحد، بالنسبة للإصابة بفيروس موزايك الكرنب، فقد كانت نسبة الإصابة بين النباتات الطويلة ٣٠٪، بينما كانت ١٥٪ من بين النباتات متوسطة الطول، أما ٥٪ من النباتات القصيرة كانت مصابة.

ثانيا: العوامل الطبيعية:

الموسمية والظروف الجوية:

للعوامل الجوية تأثير كبير على مدى إصابة المحاصيل الحولية بالفيروسات، فقد أوضح Watson & Hoathcot انه من العوامل المهمة لانتشار المرض، الهجرة المبكرة للمن، ومع ذلك فهناك عوامل أخرى لا تقل أهمية، فعلى سبيل المثال فى يونيو سنة ١٩٤٥ سجلت أعداد قليلة من المن *M. persicae*. وفى هذا العام لوحظت إصابة وبائية بالأمراض الفيروسية المهمة، بينما فى يونيو سنة ١٩٤٦ سجلت أكبر كمية من المن المذكور خلال ثمانية سنوات، أجريت خلالها الدراسة، وعلى الرغم من ذلك كانت الإصابة الفيروسية قليلة النسبة. ومن هنا يمكن القول بكل تأكيد أنه على مدى ثمانى سنوات، كان العامل المهم فى تحديد شدة الإصابة الفيروسية هو درجة إصابة المحصول فى المزارع المجاورة.

فعلى أساس النتائج المتحصل عليها عند استخدام مصدر مشابه للعدوى، يمكن الاعتقاد أن التفاوت الموسمى فى نسبة الإصابة فى محصول ما مثل بنجر السكر، فمن

المحتمل أن تكون نتيجة التأثير المستمر للظروف الجوية على أعداد المن الناقل على مدى الوقت الأطول من موسم النمو؛ حيث إن هذه الظروف تؤثر على مواعيد تكاثر وأعداد المن المهاجر الى المزرعة، وعلى نمو المستعمرات داخل المحصول، وعلى سرعة تحركه.

ومن الممكن أن تؤدى الظروف الجوية غير العادية الى انفجار وبائى للمرض، عما هو معروف عنه فى منطقة معينة بالنسبة لمحصول معين كل عام، ومن أوضح الأمثلة على ذلك ما حدث سنة ١٩٦٣ بالنسبة للقمح الشتوى فى جنوب البرتا حيث يزرع عادة القمح الشتوى فى الأسابيع الأولى من سبتمبر، وهذا يؤدى الى هروب المحصول من الإصابة بفيروس موزايك القمح، والذى يعتبر القمح الربيعى هو المصدر الرئيسى له، ولكن فى سنة ١٩٦٣ كانت الظروف الجوية غير عادية؛ حيث كانت كمية الأمطار فى الربيع قليلة بشكل ملحوظ عن المعدل الطبيعى لها، فخرج القمح الربيعى قليل الكثافة؛ لعدم إنبات كثير من البذور، وفجأة تغير هذا الموقف حيث هطلت الأمطار ففى المناطق التى تعرضت للجفاف من قبل بدأت تنبت الحبوب التى لم تنبت من قبل «أى بعد شهر تأخير»، كما أن النباتات التى كانت قد توقفت عن النمو بسبب الجفاف بدأت تنمو وتتفرع . وفى يونيو ويوليو كان معدل الأمطار فوق المعدل الطبيعى مما دفع النباتات للنمو السريع، كما أدى عدم التمكن من إجراء العمليات الزراعية كالحرث والخدمة الى زيادة البقايا النباتية والحشائش. وفى المناطق التى تعرضت للجفاف فى أول الموسم، لم يتمكن من الوصول الى مرحلة النضج قبل نهاية سبتمبر، وأصبحت تشكل مصدراً خطيراً للعدوى، التى تنتقل منها الى القمح الشتوى؛ ولذا فإن مزارع القمح الشتوى والتى تزرع عادة فى أول سبتمر، تعرضت بشدة فى أول حياتها للإصابة الفيروسية، وفى الخريف أيضاً كانت الطبيعة على غير المعتاد، مما ساعد على انتشار الناقل والفيروس؛ فقد كانت درجة الحرارة فى سبتمر ٣٥،٥ْم أى بزيادة ٥،٥ْم من معدلها فى مدى ثلاثين عاما، كما ظلت درجة الحرارة المرتفعة نسبيا سائدة أيضا فى شهر أكتوبر.

أما موسم ١٩٦٤، فلم يكن مناسبًا لانتشار الفيروس، ولكن نظراً لانتشاره الواسع فى الحقول المنزرعة بالقمح الشتوى من قبل حلول الجليد فى عام ١٩٦٣، فقد ماتت مساحات

كبيرة مزروعة بالحبوب ، كما تؤثر بعض العوامل الطبيعية على سرعة تكاثر وانتشار الناقلات للفيروسات وتحركها. ومن هذه العوامل: درجة حرارة الهواء والرطوبة والرياح. فلقد وجد أن درجات الحرارة المرتفعة تودى إلى تقليل أعداد المن وإعاقة تكاثره. كما أن الرياح تعتبر من العوامل المهمة، التى لا تؤثر فقط على انتشار الناقل والفيروس الذى ينقله فحسب، بل وتؤثر كذلك على اتجاه هذا الانتشار؛ فالرياح الشديدة من الممكن أن تؤدى إلى تقليل أعداد الحشرات الناقلة فى منطقة معينة، وبالتالى تقليل نسبة النباتات المصابة فى هذه المنطقة، فعلى سبيل المثال فإن ناقلات فيروس تشوه براعم الكاكاو عادة غير نشطة، وتنقل الفيروس على مسافات قصيرة، ومع ذلك فمن الممكن أن تنقل إلى مسافات بعيدة بواسطة الرياح، ومن ناحية أخرى.. فإن المن المجنحة فى العادة لا تطير عندما تهب الرياح الشديدة، ولكن اتجاه طيرانها غالبًا ما يتغير تبعاً لاتجاه الرياح.

كما أن الرياح الشديدة غالبا ما تنقل المن إلى مسافات بعيدة. وكذا يتحدد اتجاه نطاطات الأوراق باتجاه الرياح، فمن المعروف أن نطاط الأوراق ***C. tenellus*** لا يمكن أن يطير عكس الرياح التى تبلغ سرعتها ٣٠كم /ساعة.

التربة:

إن ظروف التربة هى الأخرى تؤثر بوسيلة أو بأخرى على مدى وسرعة انتشار الأمراض الفيروسية؛ حيث إن فرص انتشار الأمراض الفيروسية تكون كبيرة فى حالة التربة الخصبة.

كما وجد أن إضافة الأسمدة العضوية وغير العضوية أدى إلى زيادة إصابة البطاطس بفيروس التفاف الأوراق، وكذا بفيروس TMV حيث إن هذه الظروف تكون مناسبة لسرعة تكاثر المن الناقل لهذا الفيروس على هذه النباتات، كما تؤثر تغذية النبات أيضا على درجة الإصابة وشدة ظهور الأعراض، فقد تجعلها غير واضحة أو تزيد من درجة وضوحها.

كما أن ظروف التربة يكون لها تأثير كبير أو تلعب دوراً كبيراً فى بقاء فيروس TMV فى البقايا النباتية بالتربة، كما سبق أن ذكرنا؛ حيث يفقد الفيروس نشاطه وقدرته على العدوى

فى التربة الرطبة، وكذا فى الأراضى جيدة التهوية أسرع من الأراضى الجافة وغير المسامية أو المطبلة.

كما أن درجة الحرارة فى التربة من الممكن أن تؤثر على نقل الفيروس بواسطة النيماتودا. فقد وجد Debort سنة ١٩٦٤ أن فيروس التبقع الحلقى فى الشليك انتقل بواسطة نيماتودا *Longidorus macrosona* عند درجة ٢٠ْم إلى ١٦ نباتاً من ٢٠ نباتاً بينما عند درجة حرارة ٣٠ْم لم يتم النقل، ومع ذلك لم يكن إلا إخفاق فى نقل الفيروس عند درجات الحرارة العالية راجعاً الى موت النيماتودا، حيث كانت أعدادها ثابتة تقريباً، عند درجات الحرارة التى أجريت عليها التجربة، ولكن يعتقد أن درجات الحرارة العالية ذات تأثير سيئ على تغذية النيماتودا.

بقاء الفيروس على مدى دورة سنوية:

من الممكن أن يتحقق بقاء الفيروس فى خلال فصل الشتاء بعوامل مختلفة، تختلف باختلاف الفيروسات، حيث توجد فيروسات لها القدرة على البقاء بمساعدة عدة طرق مختلفة، نذكر منها :

١ - كثير من الفيروسات يمكنها أن تنتقل من موسم لآخر، مستخدمة هذا أو ذاك من العوائل النباتية أو فى التقاوى، سواء كانت بذوراً حقيقية أم أجزاء خضرية تكاثرية. وهنا أيضا يمكن أن نذكر الفيروسات التى تتجنب الظروف غير المناسبة فى بعض أوقات السنة بإصابتها النباتات المعمرة أومحمولة فى الدرنات وغيرها، كما يمكن أن تستخدم النباتات التى تبقى فى الحقل خلال فصل الشتاء مثل البنجر «بنجر المائدة»، وهذا الكلام ينطبق على البلاد التى يكون الشتاء فيها ثلجيًّا، ولا توجد مثل هذه الحالة فى جمهورية مصر العربية؛ حيث توجد لدينا مزروعات شتوية وأخرى صيفية.

٢ - كما سبق أن ذكرنا فإن الفيروسات التى يمكنها أن تصيب مدى عوائلى واسعاً يمكنها البقاء فى الطبيعة؛ إذا وجدت فى عوائلها نباتات معمرة أو حولية، لاتزرع فى وقت

واحد؛ أى تزرع فى أوقات مختلفة من العام، وكذلك النباتات التى يصل الفيروس إلى أجنة بذورها.

٣ – الفيروسات التى تنتقل عن طريق الجاسيد Gacids حيث يمكنها أن تعبر موسماً إلى موسم آخر، عن طريق البيض الذى تضعه هذه الحشرات.

٤ – الفيروسات التى يمكنها أن تقضى الموسم ذا الظروف غير المناسبة فى البقاية النباتية فى التربة مثل فيروس TMV، وكذلك على الحشائش، وفى عوائل أخرى كما سبق أن ذكرنا.

٥ – من الممكن ان تقضى الفيروسات التى تنتقل عن طريق الفطريات فترات طويلة فى الجراثيم الساكنة لهذه الفطريات إلى أن تتحسن الظروف، ويزرع العائل المناسب مثل فيروس تضخم عروق الخس.

٦ – قد تؤدى العمليات الزراعية والدورة الزراعية فى بعض المناطق الى بقاء الفيروس على مدار العام متنقلاً من محصول الى محصول، والتى تتوالى خلال الدورة، وهذا يتم فى المناطق التى تسمح فيها الظروف المناخية بتوالى المحاصيل، أو فى المناطق التى تنمو فيها المحاصيل البرية جنبا إلى جنب مع المحاصيل الاقتصادية، أو فى تلك المناطق التى تتوالى فيها زراعة القمح الربيعى والقمح الشتوى؛ حيث يوجد فيروس موزايك القمح، طالما وجد النبات الحى.

الباب العاشر

مقاومة فيروسات النبات

Control of Plant Viruses

مقاومة فيروسات النبات

CONTROL OF PLANT VIRUSES

إن الوسيلة الأساسية لوقاية النباتات من الأمراض الفطرية هى المعاملة بالمطهرات الفطرية؛ حيث تستخدم المطهرات الفطرية إما لوقاية النباتات من الإصابة أو لعلاج المرض أو الحد منه. أما بالنسبة للأمراض الفيروسية فلا تعرف مثل هذه الطرق المباشرة، بل إن الطرق الأساسية فى الحد من انتشار الأمراض الفيروسية تأخذ الطابع غير المباشر، حيث تجرى هذه الطرق بغرض تقليل مصادر العدوى داخل أو خارج الحقول، أو الحد من انتشار الناقلات الفيروسية، أو تقليل تأثير الفيروس على النبات إلى أدنى حد ممكن. ومع ذلك فيمكن القول أن استخدام هذه أو تلك من الوسائل فى مكان ما لا يحل المشكلة، حيث إن مقاومة الأمراض الفيروسية إجراء غير وقتى، ويتطلب توحيد واستمرار الجهود من سنة لأخرى، ولا يشذ عن ذلك إلا فى حالة وجود صنف ما من المحاصيل مقاوم أو منيع لهذا أو ذاك من الفيروسات، ولكن ذلك لا ينطبق فى أغلب الأحوال على كل الفيروسات؛ حيث إن الصنف قد يكون منيعًا لفيروس ما، بينما يكون قابلا للإصابة أو حساسًا لفيروس آخر أو فيروسات أخرى، أو حتى لسلالات جديدة من الفيروس نفسه، الذى أظهر نوعًا من المقاومة أو المناعة بالنسبة له.

وسنحاول أن نناقش الطرق المختلفة التى تستخدم فى مقاومة الأمراض الفيروسية التى تصيب النباتات، وهنا يجب أن نذكر أن الإصابة بالفيروسات تزيد من حساسية النبات لأى مرض آخر؛ حيث إنه من المعروف أن إصابة بنجر السكر بفيروس الاصفرار تزيد من حساسية أو قابلية النبات للإصابة بفطر *Alternaria* ، إلا ان هذا التأثير الثانوى للفيروسات أمكن فى بعض السنوات التغلب عليه باستخدام المطهرات الفطرية المناسبة.

ولكى تصبح طرق المقاومة مفيدة أو ناجحة، يجب فى بداية الأمر أن يعرف بدقة الفيروس أو الفيروسات المسئولة عن المرض أو الأمراض التى تصيب محصولاً ما. وكما هو

معروف فإن الأعراض المرضية لا يمكن ان تستخدم وحدها فى تعريف المسبب الفيروسى.

فعلى سبيل المثال فإن الخس يصاب بأكثر من ١٤ فيروسًا مختلفًا، تنتشر بواسطة المن ونطاطات الأوراق والتربس والنيماتودا أو الفطريات. وعدد كبير من هذه الفيروسات يسبب مرض التبرقش البرونزى (كما تتكون على أوراق النباتات نقط نكروزية)، ثم يصفر معظم النبات ويتوقف نموه. وهناك مثال آخر وهو إصابة محصول بنجر السكر بالاصفرار فى الأقاليم الغربية للولايات المتحدة الأمريكية؛ حيث ظل معتبرا على أنه فيروس الاصفرار العادى إلى أن تمكن Duffus سنة ١٩٦٠ من عزل فيروس الاصفرار الغربى، والذى يسبب تقريبًا الأعراض نفسها التى يسببها الفيروس العادى.

أولا: التخلص من مصادر العدوى:

من الواضح أنه إذا كانت التقاوى سواء كانت بذوراً أو أجزاء خضرية خالية أساسًا من الإصابة الفيروسية، وكانت التربة خالية من مصادر الإصابة، وكذا لا توجد الناقلات فإنه لن تكون هناك حاجة أصلاً لمقاومة الأمراض الفيروسية. **ولكى نتبع طريقًا معينًا للتخلص من مصادر العدوى فى حقل ما، يجب أن نعلم أولاً طبيعة هذا المصدر والوسيلة التى ينتقل بها الفيروس منه الى النباتات السليمة:**

أولاً: النباتات الحية كمصادر للإصابة بالفيروسات:

١ - الحشائش المعمرة والحولية التى ينتقل الفيروس عن طريق بذورها، أو تلك التى تكون منها عدة أجيال متعاقبة خلال العام.

٢ - نباتات الزينة المعمرة التى يظهر عليها المرض بصورة ضعيفة.

٣ - المحاصيل غير الشقيقة.

٤ - نباتات من النوع نفسه باقية من العام السابق.

٥ - النباتات ذوات الحولين فى العام الثانى، حيث تنمو مبكراً لتكون البذور وتنتقل منها الفيروسات الى النباتات المزروعة من المحصول نفسه، ولكن فى عامها الأول كما هو فى بنجر السكر وغيرها من محاصيل الخضر.

ويظهر لأول وهلة أن عدداً من هذه المصادر يمكن التخلص منه بسهولة، ولكن من الناحية العملية صعب التنفيذ، وغالبا ما يكون مستحيلاً في المساحات المنزرعة، حتى ولو كانت مزراع صغيرة . ومثال ذلك أنه من الصعب التخلص من جميع درنات البطاطس المتبقية من المحصول السابق. وفي المناطق المعتدلة وتحت الاستوائية ينمو عدد كبير من النباتات التي تعتبر مخازن لعديد من الفيروسات؛ ولذلك فإن تنفيذ مثل هذا الإجراء في مثل هذه المزارع أمر صعب، بل يكاد يكون متعذرا.

وتتوقف فعالية هذا الإجراء؛ أي التخلص من مصادر الإصابة بالفيروس في منطقة ما بالدرجة الأولى على المجال العوائلي لهذا الفيروس: فإذا كان هذا المدى العوائلي ضيقا يكون من المناسب إجراء ذلك، أما إذا كان مدى النباتات الحساسة للإصابة بهذا الفيروس واسعًا مثل فيروس تبرقش الخيار (CMV) أو فيروس التبرقش البرونزي في الطماطم يكون مثل هذا الإجراء في أغلب الأحوال قليل الجدوى.

١ - البقايا النباتية:

إن البقايا النباتية في التربة سواء في الحقول أو الصوب الزجاجية تعتبر مصادر تختزن الفيروسات، خصوصا تلك التي تنتقل ميكانيكيا؛ حيث تنتقل منها الفيروسات الى المحاصيل التالية لها.

وإذا كانت مثل هذه الفيروسات من الفيروسات شديدة الثبات مثل فيروس TMV .. فإن الوسائل الوقائية مهمة جداً، خصوصا إذا كانت محاصيل حساسة لهذا الفيروس تزرع عامًا بعد عام في المكان نفسه.

٢ - تقليع النباتات المصابة:

في بعض الأحيان يكون تقليع النباتات المصابة مجديًا وميسوراً، ولكن مثل هذه الوسيلة تكون عديمة الجدوى ولا معنى لها إذا كان الفيروس يغزو المحصول بسرعة من أي مصدر آخر خارجي. ويجب أن يتم تقليع النباتات المصابة في بداية الموسم، وذلك في حالة النباتات المعمرة، فإنه إذا كان انتشار الفيروس بطيئًا فإنه يكون من المفيد اقتلاع النباتات المصابة وإحلال أخرى سليمة محلها، ويتم ذلك على سبيل المثال في حالة إصابة الخوخ بفيروس

الموزايك. وبواسطة المعادلة التى سبق أن وضعها فان ديوربلانك والتى سبقت الإشارة إليها، يمكن التعرف عما إذا كانت العدوى ذات مصدر داخلى أو خارجى.

٣ - استخدام بذور خالية من الفيروس:

فى حالة ما إذا كانت الفيروسات تنتقل عن طريق البذور الحقيقية.. فإن البذور تكون أحد المصادر المهمة لنشر هذا الفيروس؛ حيث إن انتقال الفيروس يتم مبكراً بين البادرات عند الإنبات.

أما إذا كانت البذور هى المصدر الأساسى أو الوحيد لنشر العدوى، وإذا كان من الممكن زراعة النباتات فى ظروف معزولة لحد ما عن المصادر الخارجية.. فيكون استخدام البذور الخالية من الفيروس أو حتى التى تحتوى نسبة ضئيلة من الإصابة، إحدى الوسائل الفعالة فى مقاومة الفيروس أو أهم هذه الوسائل على الإطلاق.

وقد يكون فيروس تبرقش الخس من أحسن الأمثلة على ذلك، فلقد وجد Grogan et al سنة ١٩٥٢ فى ولاية كاليفورنيا بالولايات المتحدة الأمريكية أنه عند زراعة خس اللاكتوجا من بذور خالية من الفيروس، كانت نسبة النباتات المصابة عند النضج أقل بكثير من المساحات المجاورة والمزروعة ببذور تجارية. ولم تعط هذه الطريقة إصابات كبيرة لوقت طويل؛ حيث لم يكن واضحا أنه حتى فى حالة الإصابة الخفيفة فى البذور، فمن الممكن أن تكون إصابة الحقل شديدة، ويكفى لذلك أن يتوافر ناقل نشط. ولذلك فلقد أوضحت التجارب التى أجريت فى كاليفورنيا أن نسبة الإصابة فى البذور لا يجب أن تتعدى ١ر٠٪ وفى الجدول التالى توضح نتائج ثمان تجارب.

نسبة الإصابة فى البذور ٪	نسبة الإصابة الحقلية فى مرحلة النضج ٪
صفر	٤ر٣
١ر٠	٦ر٧
٤ر٠	١ر٢٠
٦ر١	٥ر٢٩

وقد عالج Tomlinson سنة ١٩٦٣ هذا الموضوع فى إنجلترا، وأجرى مثل هذه التجارب وتوصل إلى نتائج مشابهة. ولكى نحصل على التأثير المناسب من مثل هذه الوسيلة فى المقاومة؛ أى استخدام بذور خالية أو ضئيلة الإصابة بالفيروسات، يجب إدخال نظم التقييم والشهادات الصادقة عن أن هذه البذور جمعت من نباتات، زرعت فى مناطق تتوافر بها ظروف العزل المناسب. ولقد أوضحت البحوث الحديثة أنه حتى زراعة بذور الخس التى تحوى نسبة ١ر٠٪ إصابة بفيروس الموزايك.. فإن ذلك لا يحمى المحصول من إصابة ثقيلة. والآن فى ولاية كاليفورنيا فى وادى ساليناس، تستخدم تلك البذور الخالية تمامًا حيث عند فحص ٣٠ر٠٠٠ بذرة لم توجد بذرة واحدة مصابة بهذا الفيروس.

٤ - استخدام أجزاء خضرية خالية من الفيروس:

إن المصدر الرئيسى لأغلب النباتات التى تتكاثر خضريا هو العدوى السابقة لمثل هذه النباتات، ولذا تعتبر طريقة زراعة أجزاء خضرية خالية من الإصابة هى أهم وسيلة لمقاومة فيروسات مثل هذه النباتات.

ولتحقيق ذلك يجب أن تحل مشكلتان:

أولاهما:

يجب أن نتوصل إلى صنف معين خالٍ من الفيروس، وإذا كان الصنف مصابًا بالكامل فيجب أن تجرى التجارب لتخليصه من هذه الفيروسات.

وثانيتهما:

إذا ما توصلنا إلى الصنف الخالى من الإصابة، فيجب الحفاظ ولو على جزء منه، خالٍ تماما من الإصابة وزراعة الجزء الباقى فى ظروف لا تسمح إلا بالحد الأدنى المسموح به للإصابة.

ويسمى ذلك بالنويات الخالية، والتى تتكاثر حتى يمكن زراعتها فى المساحات الواسعة على النطاق التجارى.

طرق تعرُّف التقاوى الخالية من الفيروس:

كما سبق أن ذكرنا فإن الطرق البصرية التى تعتمد على المظاهر المرضية الظاهرية فى

التعرف على الإصابة الفيروسية لا يمكن الاعتماد عليها بمفردها فى انتخاب النباتات السليمة، ولذا يجب اللجوء هنا الى طرق التشخيص الموثوق بها، فى التعرف على النباتات المصابة والسليمة. ومثل هذه الطرق موجودة، إلا أن لكل طريقة مجالاً للاستخدام، وهذا يتوقف على كل من الفيروس والعائل. فتعريف أغلب الفيروسات خصوصا تلك التى تصيب الأشجار المعمرة يعتبر من الأعمال الصعبة، وفى هذه الحالة يعتبر التطعيم على أحد أو عدد من النباتات الحساسة هو الطريقة الأساسية. وحيث إن انتشار الإصابة خلال الشجرة خصوصا فى المراحل الأولى للإصابة لا يكون متساويًا، وحتى يمكن التأكد من أن الجزء المنتخب منها خاليا من الإصابة، فيجب إعادة الاختبار لعدد آخر من السنين، حتى يمكن التأكد من عدم وجود الفيروس. ولذلك فإن Hampton سنة ١٩٦٦قام باختبار أربعة براعم من الشجرة الأم على كل نبات اختبار، ووجد أنه فى خلال السنة الأولى من إصابة أشجار الخوخ لا يمكن كشف الإصابة باستمرار على أشجار الكريز، بينما يرتفع احتمال كشف الإصابة بعد مرور ثلاث سنوات. كما أن التوزيع غير المتساوى للإصابة الفيروسية يوجد أيضًا خلال النباتات العشبية. وقد وجد Beemster فى هولندا أن إصابة نباتات البطاطس بفيروس Y لا تستدعى بالضرورة أن تكون جميع الدرنات مصابة بهذا الفيروس، كما أنه وجد أنه ليست كل العيون على الدرنة تحوى الفيروس، ووجد أن الجزء السفلى من الدرنة يكون أقل إصابة من القمة، ولذلك فإن القمة تكون هى الجزء المناسب لإجراء الاختبار.

ولتعريف عدد كبير من الفيروسات، يمكن استخدام طريقة العدوى الصناعية على نباتات الاختبار، كما تستخدم أيضا طرق التشخيص السيرولوجية، كما تستخدم طرق التشخيص السيتولوجية والكيماوية والميكروسكوب الإلكترونى، ومع ذلك فما زالت طريقة الاختبار بالعدوى هى الطريقة المثلى فى انتخاب النباتات السليمة.

طرق إنتاج النباتات الخالية من الفيروس:

الحصول على النباتات الخالية من الفيروس فى الظروف الطبيعية:

أحياناً فى مساحة ما من الممكن أن يلاحظ نباتات فردية من الصنف نفسه غير مصابة بفيروس ما. وإذا لم يكن من الممكن العثور على مثل هذه النباتات فإنه أحيانا ما يكون

مفيداً استخدام تلك الطرق التى سبق الإشارة إليها، مع اعتبار أن الفيروس لا يتوزع بانتظام داخل النباتات، وخصوصا إذا ما كان التعامل يجرى مع أشجار الفاكهة المعمرة. وفى هذه الحالة تؤخذ البراعم غير المصابة من الشجرة. وإذا كان الفيروس يصيب النبات إصابة جهازية؛ فإنه لا يتمكن من الوصول إلى القمة المرستيمية للأفرع سريعة النمو، ومن جراء ذلك فإن Holmes سنة ١٩٦٠ تمكن من الحصول على نبات Dahlia داليا خالٍ من فيروس التبرقش البرونزى فى الطماطم. إلا أن النباتات التى تتكاثر خضريا تكون مصابة فعليا ١٠٠٪ بهذا الفيروس أو ذاك، وفى هذه الحالة **للحصول على مصدر خالٍ من الفيروس لاستخدامه كتقاوى، يجب استخدام إحدى الوسائل التالية:**

أ - العلاج الحرارى: Theromotherapy

يعتبر العلاج الحرارى أكثر الوسائل استعمالاً فى تخليص الأجزاء النباتية من الإصابة الفيروسية . وقد أحصى Hollings سنة ١٩٦٥ أكثر من ٩٠ فيروسا، أمكن تخليص الأجزاء النباتية منها بواسطة العلاج الحرارى على الأقل فى نوع واحد من العوائل.

ويمكن تعريض نوعين من الأجزاء النباتية للمعاملة الحرارية:

أولهما: الأجزاء النباتية الكامنة (الدرنات - البراعم فى الأشجار - عقل قصب السكر)؛ حيث يمكنها أن تتحمل درجات الحرارة المرتفعة نسبيًا بصورة أكثر من الأجزاء النشطة. ويكون تأثير المعاملة هنا مرتبطًا بالتأثير المباشر للحرارة على الفيروس. وتختلف درجة الحرارة وفترة التعريض لها اختلافات كبيرة من ٣٥ - ٥٤°م، ومن عدة دقائق إلى عدة ساعات. وغالبًا ما يستخدم الماء الساخن؛ حيث إنه فى حالة فترة التعريض القليلة، فإن الهواء الساخن لا يسمح بتعريض جميع الأجزاء بدرجات متساوية. وإذا لم تكن جميع الأنسجة سخنت بدرجة متساوية.. فإن المعاملة بالهواء الساخن الجاف تكون قليلة الفائدة عن الماء الساخن.

وثانيهما: فغالبًا ما تستخدم المعاملة الحرارية فى علاج الأنسجة النشطة النامية، وفى هذه الحالة يستخدم الهواء الساخن، ولايستخدم الماء الساخن، وهنا فإن مدة التعريض تستمر لعدة أسابيع على درجة حرارة ٣٥ - ٤٠°م، وهذه المعاملة تحقق أقل نسبة موت بين النباتات المعاملة، كما أن درجة الحرارة ومدة التعريض تختلف فى حدود واسعة باختلاف الفيروسات.

وغالبا ما يفصل بعد المعاملة الحرارية مباشرة لقمم النامية للبراعم؛ حيث إنها تكون خالية من الفيروس، بينما تظل بقية البراعم محتوية على الفيروس.

إلا أن العلاج الحرارى يكون عديم الجدوى، إذا ما كان الفيروس شديد الثبات وأكثر تحملا لدرجات الحرارة العالية، مثل فيروس TMV. وهنا يجب ألا نسبق الأحداث لنخرج بإجابة محددة عما إذا كان من الممكن تخليص هذا أو ذاك من النباتات من فيروس مثل هذا الفيروس أم لا؟ حيث إنه ليس واضحًا فى الوقت الحاضر الميكانيكية، التى يتم بها تخليص الأنسجة من الفيروس، فمن الممكن أن تهدم الفيروس نفسه أو الإخلال بعملية تضاعف الفيروسات.

وفى حالة الفيروسات الثابتة مثل فيروس X البطاطس.. فإنه من الممكن تخليص بعض أجزاء النبات من الإصابة إذا ما خزنت لعدة شهور عند درجة حرارة منخفضة نسبيا «٣٥ْم»، ويرى Mellor وآخرون سنة ١٩٦٧ أنه من الممكن إجراء ذلك خلال الخريف أو الشتاء؛ حتى يمكن الانتهاء منها قبل بداية موسم الزراعة؛ وأمكن التخلص من فيروسين هما S & X دفعة واحدة، عندما خزنت البطاطس عند درجة حرارة ٣٣ – ٣٧ْم لمدة عدة شهور، بعد نزع البراعم الإبطية بطول ٣ر – ٠ر١ مم من النباتات وزراعتها على بيئات صناعية.

زراعة الأنسجة المرستيمية:

توجد بعض الأعمال التى تشير الى أن بعض الفيروسات من الممكن أن تنفذ الى الميرستيمات الاولية. وقد وجد Smith , Mcwhorter سنة ١٩٥٧ أن الانقسام الميتوزى فى الميرستيمات القمية لجذر وساق نباتات الفول يبطؤ أو يصيبه الشلل؛ نتيجة للإصابة بفيرس النقط الحلقية فى الطماطم؛ حيث ظهرت الفجوات فى تلك الخلايا ثم ماتت.

كما ظهرت ملحقات شبيهة بالفيروسات فى الميرستيمات القمية والبروكامبيوم فى الساق، أما فى المرستيمات القمية فى الجذور، فقد ظهرت هذه الملحقات على بعد ٢٠ خلية من القمة.

وعند عدوى القمة النامية لجذر الفول بسلالة فيروس تبرقش الخيار التى تصيب الطماطم

مسببة النقط الحلقية، نفذ الفيروس إلى جميع خلايا الميرستيم القمى. وقد أظهرت الدراسات السيتولوجية موت القمة النامية للجذر، وبعد ذلك ماتت أيضا الخلايا البالغة. وبفحص خلايا الميرستيمات القمية بواسطة الميكروسكوب الإلكترونى ظهر بها الفيروس، وهذا كان قد ثبت بالنسبة لبعض الفيروسات فى عوائل مختلفة.

إلا أنه فى كثير من التغييرات فى الثنائى «فيروس + عائل» ثبت أنه توجد بالقرب من القمة النامية للجذر والساق منطقة ذات حجم كبير أو صغير، خالية تمامًا من الجزئيات الفيروسية، أو تحتوى على عدد ضئيل جدا من هذه الجزئيات. وهذا ما دعا بعض الباحثين للحصول على عدد من الخلايا الخالية من الفيروس وزراعتها.

ومع ذلك فمن الصعب إثبات أو التأكد من غياب الفيروس فى الخلايات الميرستيمية القمية؛ ولذلك فمن الضرورى أن تعطى هذه الانسجة المعزولة الفرصة للنمو بعض الوقت، حتى إذا ما كان بها حتى ولو تكاثرت كمية ضئيلة من الفيروس، وأمكن الكشف عنها بسهولة، ومن ناحية أخرى فإن بعض الفيروسات تفقد بزراعة الأنسجة على البيئات الصناعية.

ومن المعروف أن مادة الكينتين تؤدى إلى وقف تضاعف الفيروسات، ولذا يلجأ بعض الباحثين إلى إضافة هذه المادة أو ما يشابهها فى البيئة المستخدمة لزراعة الأنسجة الخالية من الفيروسات .ولا توجد مواد شبيهة لتلك التى تؤثر تأثيراً ملحوظًا على أعداد الجسيمات الفيروسية الموجودة فى المرستيمات القمية.

ومن بين الفيروسات التى لا تنفذ إلى القمة النامية للساق، فيروس موزايك الداليا فى الداليا، وعدد من فيروسات البطاطس مثل فيروس A وفيروسY وفيروس S وفيروس X، وتبلغ المسافة الخالية من مثل هذه الفيروسات حوالى ١٠٠–٢٠٠ مليميكرون، إلا أن هذه المسافة تكون كبيرة بالنسبة لبعض الفيروسات الأخرى؛ حيث تصل الى ٤٠٠ – ١٠٠٠ مليميكرون.

وبعد المنطقة ا لمرسيتيمية الخالية من الفيروس، يتدرج تركيز الفيروس فى المناطق التى تليها، حيث يكون التركيز الأكبر فى الخلايا البالغة.

وليس من المفهوم حتى الآن الأسباب التى تجعل المنطقة الميرستيمية غير مناسبة لتكاثر الفيروسات، إلا أنه توجد بعض الفروض التى تحاول تفسير ذلك :

١ – منطقة النمو تنقسم بسرعة، وبالتالى تبعد بسرعة، وأن الفيروس لا يمكنه ملاحقتها أو الوصول اليها. ولكن هذا الفرض له نواقصه، ويعتبر أقل احتمالا حيث إن Bald وSolberg سنة ١٩٦٢ وجدا أن القمة النامية من ساق نبات ***N. glauca*** تنمو بمعدل ١ سم فى اليوم، وهذا يزيد بالفعل عن معدل السرعة المعروف بالنسبة لانتقال الفيروس من خلية لأخرى، ولكن اذا سقط الفيروس فعلاً فى هذه المنطقة التى يزيد فيها حجم الخلايا، فإنه مع نمو الخلايا، لابد أن ينتقل إلى الأمام.

٢ – وجود عوائق فى طريق تقدم الفيروس، فعلى سبيل المثال تكون أقطار البلازموديسماتا ضئيلة للغاية، إلا أنه لا توجد نتائج عملية نتيجة لتجارب حتى يمكن إثبات صحة هذا الفرض.

٣ – إن التغييرات البيوكيماوية التى تحدث فى الخلايا ذات الأنقسام النشط تعوق عملية تضاعف الفيروسات، ولكن ذلك مجرد افتراض يحتاج إلى إثبات حيث إنه ببساطة مازال من غير المعروف على وجه الدقة تلك التغيرات المشار إليها.

وبعد أن تكلمنا عن توزيع الفيروسات فى الميرستيمات القمية، فإنه يمكن اعتبار طريقة زراعة الأنسجة الميرستيمية القمية من الطرق الفعالة لإنتاج نباتات خالية من الإصابة الفيروسية خصوصا تلك النباتات التى تتكاثر خضريا وتخليصها من بعض الفيروسات. وقد أوضح Hollings سنة ١٩٦٥ أنه فى حالة زراعة الأنسجة الميرسيتمية، يكون الميرستيم القمى وكذا الزوج الأول من البادئات الورقية Primorodium خاليا من الفيروس، ويختلف طول هذه المسافة عند النباتات المختلفة حيث يتراوح ما بين ١ر٠ – ٥ر٠ مم، إلا أن طول القمة المتبقية بعد المعاملة الحرارية عادة يتراوح بين ٢ر٠ – ٢ سم، ويختلف أقل طول يمكن استخدامه فى زراعة الأنسجة الميرستيمية باختلاف النباتات.

وحتى يمكن تمثيل كل النبات، يفضل عند زراعة الأنسجة أن يحتوى الميرستيم القمى

على الأقل على زوج واحد من البادئات الورقية Primordium . وقد استخدم الباحثون بيئات مختلفة لزراعة الأنسجة الميرستيمية، وتحتوى أساسا البيئة على الأملاح المعدنية (Macro and micro) والسكروز، وواحد أو أكثر من منشطات النمو (وعلى سبيل المثال الجبرلين) حينما تنمى الأنسجة على الآجار.

ومنذ أن اقترح Moral طريقة زراعة الأنسجة ١٩٤٨، شاع استخدام تلك الطريقة فى الحصول على النباتات الخالية من الفيروسات، وقد استطاع Hollings كما سبق أن ذكرنا أن يتخلص من ٢٢ فيروسًا بهذه الطريقة. كما تستخدم هذه الطريقة بنجاح خصوصًا مع النباتات التى لا تتحمل المعاملة الحرارية. وفى بعض الأحيان تعطى هذه الطريقة نتائج جيدة إذا ما اشتركت مع المعاملة الحرارية؛ حيث تستخدم الميرستيمات القمية للنباتات المعاملة حراريا. وفى مقاومة تلك الفيروسات التى يكون من الصعب التخلص منها، يمكن استخدام بعض المواد المثبطة، التى توقف تضاعف الفيروس، وفى هذه الحالة تضاف إلى البيئة الغذائية وقد استخدم Quak سنة ١٩٦١ لتخليص البطاطس من فيروس S& X مادة 2,4-D بتركيز ١ر٠ .ppm وبنفس الطريقة، أضاف Tinsley وKassanis مادة ثيوراسيل 2- Thiouracil الى البيئة للتخلص من فيروس Y البطاطس.

ويجب أن نذكر أن بعض الميرستيمات القمية فقط هى التى تعطى نباتات خالية من الفيروس، وحتى وقتنا هذا لم تعرف العوامل التى تؤدى إلى نجاح أو فشل هذه الطريقة، ومن الممكن افتراض ما يلى لتوضيح هذه الأسباب:

١ - على الرغم من غياب الفيروس فى الأنسجة الميرستيمية، إلا أن بعض تلك الأنسجة قد تكون ملوثة به سطحيًا.

٢ - من الممكن أن تكون بعض أجزاء الميرستيم خالية من الفيروس، بينما يوجد الفيروس فى الأجزاء الأخرى.

٣ - الفيروس الموجود فى الخلايا الميرستيمية من الممكن أن يفقد نشاطه وحيويته عند زراعة تلك الأنسجة على البيئات الصناعية.

وعند استخدام طريقة زراعة الأنسجة للحصول على نباتات خالية من الفيروس، من

الضرورى أن نتذكر أن النباتات النامية من الميرستيم، حتى ولو كانت سليمة ظاهريًّا، فلابد من فحصها للتأكد من خلوها؛ حيث إنه فى المراحل الأولى من النادر ان تظهر الأعراض المرضية.

الحرارة المنخفضة:

لم يدرس حتى الآن التأثير الذى تحدثه درجات الحرارة المنخفضة على نشاط الفيروس وحيويته دراسة وافية. وكان من الممكن أن ننتظر أن البرودة أو درجات الحرارة المنخفضة لا تؤثر على الفيروسات؛ خصوصًا تلك الفيروسات الثابتة فى العصير in vitro، ولكن ظهر بعد ذلك أن الزراعة فى ظروف درجات الحرارة المنخفضة تؤدى إلى تخليص النباتات من بعض الفيروسات.

فقد زرع Black و Selsky سنة ١٩٦٢ نوعًا من البرسيم عند ١٤ْم، وكان مصابًا بفيروس الورم التقرحى. ففى هذه الظروف وبعد عدة أجيال، لم تلاحظ هذه الأورام ثم أخذت قطعة من نباتات الجيل الثالث، وزرعت فى صوبة فى ظروف طبيعية، ووجد أن ٩٥٪ من هذه القطع أعطت نباتات سليمة ظاهريًّا، وكان ٩٠٪ من هذه النباتات خالية من الفيروس. ومازال من غير الواضح ميكانيكية تأثير درجات الحرارة المنخفضة على الفيروس، فقد يكون ذلك راجعًا إلى أنه فى ظروف البرودة يقل معدل تزايد الفيروس، أو إلى بطء أو قلة سرعة تحركه فى النبات، وقد يفسر هذا سبب بقاء جزء من النبات خاليًا من الإصابة . وهناك اعتقاد آخر يفسر به Black and Selsky ذلك، وهو يقوم على أساس أن تركيز الفيروس فى الورم يساوى ١٠٠ ضعف التركيز فى الأجزاء الأخرى، وأن انخفاض الحرارة يؤدى الى عدم تكون الأورام، وبالتالى ينخفض تركيز الفيروس فى الأجزاء التى يتضاعف بها، ثم ينتشر فى بقية أجزاء النبات.

العلاج الكيماوى:

لقد تناقضت النتائج التى أسفرت عنها التجارب العديدة، التى أجريت بغرض تخليص النباتات من الإصابة الفيروسية باستخدم بعض المواد المضادة للفيروسات . ويوجد قليل من الإشارات حول نجاح بعض التجارب فى شفاء النباتات باستخدام مثل هذه المواد، إلا أن النتائج التى تحصل عليها هؤلاء البحاث كانت نتيجة استخدام عدد ضئيل من النباتات، أو

كانت النتائج نفسها لا تعبر عن الواقع، وحتى الآن لم يعرف أى مركب كيماوى طريقه إلى الاستعمال العملى فى الإنتاج الواسع.

وقد وجد Pine سنة ١٩٦٧ أن حقن أشجار الخوخ بمركب Dimethylsulphoxide من الممكن أن يؤدى الى اختفاء أعراض فيروس موزايك الخوخ فى خلال سنة واحدة، وكذا فيروس التنقط والحلقات النكروزية، إلا أن هذه الأعراض تعود للظهور مرة أخرى فى العام التالى.

وكما سبق أن ذكرنا فإنه يمكن استخدام العلاج الكيماوى بمصاحبة العلاج الحرارى، أو بمصاحبة طرق أخرى مثل طريقة زراعة الأنسجة الميرستيمية.

حماية النباتات الخالية من الفيروس من العدوى الثانية:

بعد أن نحصل على النويات الخالية من الفيروسات بهذه أو تلك من الوسائل السابق الإشارة إليها، فإنه يجب إكثار مثل هذه النويات فى ظروف، لا تسمح بإعادة إصابتها بالأمراض الفيروسية مرة أخرى، وتسمح بتقييم جدواها الإنتاجية وتطابقها الوراثى للأم.

ثم يجرى بعد ذلك إكثار الإنتاج للأغراض التجارية . ويجب أن يراعى فى وقت إكثار وتوزيع التقاوى الخالية من الفيروسات، إجراء ملاحظة مستمرة فى جميع العمليات المرتبطة بالزراعة والبيع. والمثال الكلاسيكى لهذه الملاحظة نجده فى نظام الاعتماد وإعطاء الشهادات المعمول به فى بريطانيا، والذى بفضله تضاعف محصول البطاطس ثلاث مرات، وكان السبب فى ذلك هو خفض نسبة الأمراض الفيروسية؛ حيث تزرع التقاوى المفروض أنها خالية من الفيروسات بعد فحصها فى مساحات معزولة فى مناطق محددة، تكون غير مناسبة لهجرة المن وتكاثره على البطاطس، ثم تزرع النويات المنتجة بهذه الطريقة لإنتاج تقاوى عالية القيمة تزرع حينئذ، فى جميع أنحاء إنجلترا، فى مساحات تمتاز بضآلة كمية المن بها. وباستمرار يتم فحص شبكة النويات الخالية من الإصابة الفيروسية، كما ساعد استخدام المبيدات الحشرية فى توسيع شبكة المناطق التى يمكن فيها إكثار النويات لإنتاج التقاوى.

وفى الوقت الحاضر تتبع كثير من دول العالم مثل هذا النظام وغيره من النظم بالنسبة

لمختلف محاصيل الحقل والبستان؛ بما فى ذلك أشجار الفاكهة والعنب والحلويات والبطاطس. وبالنسبة لبعض المحاصيل خصوصا تلك التى تزرع من أجل زهورها أو درناتها أو أبصالها.. فإن هذه البرامج تكون محدودة تبعًا لخصائص المحاصيل المختلفة.

ومن الأسئلة التى تظهر دائمًا عند زراعة التقاوى المعتمدة (الخالية من الفيرس) سواء كانت بذوراً حقيقية أو أجزاء خضرية، الأسئلة التى تتصل بعدد النباتات، التى يجب فحصها حتى يمكن السماح باستخدم هذه التقاوى. وفى رأى **Markham et al** سنة ١٩٦٣ يجب أن يكون حجم العمل فى الاختبارات محدوداً، ولذلك يجب ألا نختبر النباتات الفردية، ولكن مجموعات منها. تجمع هذه المجموعات عشوائيا، وبعد ذلك تقارن الإصابة الحقلية بنسبة الإصابة التى قدرت فى المجموعات. وتزيد جدارة هذا الاختبار كلما زادت أعداد النباتات المراد اختبارها.

وسائل المقاومة بالعمليات الزراعية:

إخلال دورة العدوى:

لو زرع في منطقة ما محصول يعتبر العائل الرئيسى لفيروس ما أو محاصيل قريبة له، فإنها تعتبر عوائل رئيسية لهذا الفيروس أيضا، ولذلك فإنه يمكن خفض نسبة الإصابة لدرجة ملحوظة إذا ما صممت الدورة الزراعية؛ بحيث لا يوجد أى من هذه المحاصيل لوقت ما.

ومن أحسن الأمثلة على ذلك هو توحيد مواعيد زراعة القمح الشتوى فى وقت مبكر، بحيث لا يحدث أن توجد نباتات خضرية فى وقت واحد مع القمح الربيعى والقمح الشتوى. وتعطى هذه الطريقة نتائج جيدة خصوصًا إذا ما صاحبها اقتلاع البقايا النباتية والنجيليات البرية القابلة للإصابة بفيروس الموزايك المخطط فى القمح.

واذا ما روعى الحفاظ على الفترات التي لا تزرع بينها أى من المحاصيل القابلة للإصابة بالفيروس نفسه، فإن ذلك يعطى نتائج جيدة بالنسبة لعدد آخر من الفيروسات؛ خصوصًا تلك الفيروسات ذات المجال العوائلى المحدود، والتى تنتشر بواسطة المن. فعلى سبيل المثال في كاليفورنيا حيث يزرع الكرفس Celery فى منطقتين.. فإن محصول هذه الزراعات منذ سنة ١٩٣٠ حتى سنة ١٩٤٣ تناقص باستمرار، وفى عام ١٩٣٥ لم يزرع هذا المحصول لمدة خمسة أشهر، فزاد المحصول، ثم زاد المحصول أكثر فأكثر بزيادة هذه المدة.

وهناك مثال آخر على فيروس التقزم الأصفر فى البصل، حيث زرع هذا المحصول فيما بين ١٩٣٩ ـ ١٩٤٥ فى نيوزيلندا، وكان من نتيجة الإصابة الوبائية بهذا الفيروس فى هذه المنطقة أن منعت بها زراعة البصل، كما قام الزراع أيضا بإزالة البصيلات والنباتات المختلفة فى الحقول، وقد أدت هذه الإجراءات إلى منع ظهور هذا المرض فى هذه المنطقة .

تغيير مواعيد الزراعة:

إن الأمراض الفيروسية غالبا ما يشتد تأثيرها وينخفض المحصول بصورة أكبر، إذا ما حدثت الإصابة فى مراحل مبكرة من عمر النباتات، ومن ناحية أخرى فإن النباتات الناضجة غالبًا ماتكون أكثر تحملاً للإصابة من البادرات، كما أن تحرك الفيروس بها يكون بطيئًا – ولذلك فإن موعد الزراعة قد يكون ذا تأثير على موعد ظهور الإصابة وانتشارها فى الحقل إذا ما كان الحديث يدور حول الفيروسات التى تنتشر بواسطة الحشرات.

ولذلك فإن أفضل مواعيد الزراعة هى تلك التى تراعى مواعيد التزايد القصوى فى أعداد المن الناقل للفيروسات وهجرته. فإذا كان المن يهاجر مبكرا، فمن الممكن أن ينصح بتأخير الزراعة بعض الشيء، وعلى العكس إذا كانت هجرة المن تأتى متأخرة، فهنا ينصح بالتبكير فى الزراعة حيث تكون النباتات كبيرة نسبيا فى وقت هجرة المن إليها، ومن أمثلة ذلك أنه عندما زرعت البطاطس فى أسكتلندا فى الأسبوع الثالث من مايو، زادت نسبة الإصابة بفيروسات التفاف الأوراق وفيروس Y زيادة كبيرة عما إذا زرعت البطاطس فى الأسبوع الأول من إبريل، حيث إن الموعد الأخير يسمح للنباتات بالنمو فترة مناسبة قبل وصول المن إليها.

وإذا ما جرى الحديث عن التغيير فى مواعيد زراعة أو تقليع المحصول للإقلال من الإصابة الفيروسية، فإنه لابد وان نراعى تأثير ذلك على النواحى الاقتصادية والتجارية الأخرى، فعلى سبيل المثال فقد وجد Broadbent ان الزراعة المبكرة للبطاطس والتقليع المبكر يؤديان إلى خفض نسب الإصابة بالفيروسات، إلا أنها من ناحية أخرى أعطت محصولاً أقل كثيراً؛ مما يجعل تأثيرها من ناحية خفض الإصابة الفيروسية تأثيراً سلبياً.

كثافة الزراعة:

لقد سبق أن ذكرنا أنه فى حالة الزراعة الكثيفة يلاحظ انخفاض نسبة الإصابة الفيروسية. وقد درس تأثير كثافة الزراعة أو تقارب النباتات أو زيادة عدد النباتات فى وحدة المساحة على الإصابة الفيروسية، وعلى انتشار المن الناقل، وعلى المحصول على نباتات الفول السودانى. وبفحص المناطق المزروعة بكثافات مختلفة، أعطت نتائج متشابهة فى مواسم مختلفة، وقد وجد أيضا أن أعداد المن على النباتات كانت أكبر فى حالة النباتات المنزرعة على مسافات واسعة.

وعلى الرغم من انخفاض نسبة الإصابة فى حالة الزراعة الكثيفة، إلا أن التنافس بين النباتات والتزاحم بينها يؤدى فى النهاية إلى خفض المحصول، بينما تزيد قيمة التقاوى المأخوذة منها لقلة الإصابة الفيروسية بها. ويفضل استخدام كثافات الزراعة التى تسمح فقط بأن تكون التربة جميعها مغطاة بالنباتات، ولا يزيد عن ذلك حتى لا يزيد التزاحم بين النباتات؛ مما يؤدى إلى نقص المحصول. ويرى هل *Hull* أن زيادة أعداد المن على النباتات المزروعة على المسافات المتباعدة يرجع الى انجذاب المن إلى اللون الأصفر، ويفسر ذلك بتباعد النباتات، وبالتالى ظهور أوراقها الأولية الصفراء، ولكن هذا التفسير لا ينطبق فى حالة التجارب السابق شرحها فى حالة الفول السودانى، حيث كان التباعد بين النباتا دائمًا ملحوظًا.

إزالة الأجزاء النباتية التى توجد فوق سطح التربة:

حتى يمكن تحديد انتشار الفيروس فى نهاية موسم النمو الخضرى.. فإن بعض البرامج التى تهدف إلى إنتاج التقاوى الخالية من الفيروس ترى جمع النباتات مبكرا قبل الموعد المحدد، وهذا ما يحدث عند إنتاج تقاوى البطاطس فى هولندا، حيث يحددون هناك موعد تقليع المحصول بمواعيد ظهور المن الناقل للفيروسات أو على الأقل حش العرش.

وقد وجد Beemster أنه لو لم يحش العرش تمامًا، فإن هذه الطريقة تعطى نتائج عكسية؛ لان ذلك يسرع من وصول الفيروس Y & L إلى الدرنات الجديدة، ولو أن تفسير ذلك غير واضح، إلا أنه من الواضح أن الحش يؤدى الى خروج براعم جديدة، يفضل المن أن

يتجه إليها، ولذلك فيجب حرق العرش كلية، ويحدد ذلك بعد ١٥ يومًا من ظهور المن، حيث وجد أن هذه المدة تكفى لوصول الفيروس من العرش إلى الدرنات الجديدة.

مقاومة الناقلات:

قبل أن نتخذ أى إجراء، لابد بادئ ذى بدء أن نحدد الناقل المسئول عن انتشار الفيروس، وفى بعض الاحيان يكون من الصعب الحصول على تلك المعلومات.

حيث إنه دار البحث على مدى عدد كبير من السنين عن الناقل، الذى يقوم بنشر فيروس موزايك الخوخ فى ولاية كاليفورينا الأمريكية. ولهذا الغرض تم اختبار أكثر من ١٥٠ نوعًا من الحشرات، حتى نجحوا فى النهاية من إثبات أن هذا الفيروس ينتشر بواسطة الأكاروس *Eriophyes insidioses*، وفى كثير من الأحيان لا يكون الناقل الرئيسى أو حتى الناقل الوحيد لفيروس ما نوعًا مرتبطًا باستمرار بهذا المحصول أو ذاك، وقد يكون الناقل حشرة تتواجد مصادفة على هذا المحصول. وقد وجد فى أستراليا أن فيروس اصفرار الخس النيكروزى ينتقل أساسا بمن *Hyperomuzas Lactucae*، وهذا المن يتكاثر أساسًا على بعض أنواع النباتات البرية أو الحشائش الحساسة لهذا الفيروس (Sonchus sp.). وعلى الرغم من أن هذا المن ينشر الفيروس المذكور على الخس، إلا أنه لا يمكنه أن يعيش عليه طويلا لمدة لا تزيد عن بضع أيام قليلة. ومع ذلك فلابد أن تكون نباتات الخس جذابة بطريقة ما لهذه الحشرات؛ حيث إن النباتات الأخرى التى وجدت مصادفة مع الخس لم تصب بالمن ولا بالفيروس، على الرغم من قابليتها للإصابة بالفيروس تجريبيًا.

أولا: مقاومة الحشرات الناقلة:

أ- المبيدات الحشرية:

فى مقاومة الحشرات الضارة بالزراعة، يستخدم عدد كبير من المبيدات المختلفة. ولمقاومة الحشرات التى تسبب ضررا مباشرا للمحصول، لابد بداهة من تقليل أعدادها إلى أدنى حد ممكن، أو إلى الحد الذى فى وجوده لا يحدث ضرر اقتصادى للمحصول. ولكن أصعب من ذلك بكثير مقاومة الحشرات الناقلة للفيروسات، على الرغم من أنها فى حد ذاتها قد لا

تسبب ضرراً مباشراً ملموسًا للمحصول؛ حيث إنه تكفى أعداد قليلة من الحشرات لنقل الفيروسات ونشره بين النباتات، وخصوصًا من الحشرات المجنحة. وتعطى المبيدات التى تؤثر باللمس نتائج مرضية فى حالة استخدامها دوريًا أى رشها عدة مرات. إلا أن المبيدات الجهازية والباقية تعتبر أفضل من سابقتها فى مقاومة الحشرات الناقلة للفيروس، وخصوصًا إذا ما كانت هذه المبيدات سارية فى العصارة؛ وحيث إن كثيراً من الأمراض الفيروسية ينتقل إلى الحقول بواسطة المن المجنح الذى يمكنه أن ينقل الفيروس عند أول محاولة للتغذية على النباتات، حتى ولو ماتت بعد ذلك مباشرة بفعل المبيدات الجهازية، خصوصا إذا كان الفيروس ينتقل على أجزاء فم الحشرة. وفى هذه الحالة أيضا؛ أى حينما يكون الفيروس غير باق بالحشرة، فإن بقاء الحشرة فترة طويلة على النباتات، فإنها سرعان ما تفقد الفيروس، ولذلك لا توجد ضرورة بعد ذلك فى قتل الحشرة (هذا فى حالة ورود العدوى من الخارج)، وعلى العكس من ذلك يكون التعامل مع الفيروسا ت الدوارة (الداخلية) بالحشرة أو المتكاثرة بها، حيث إن المن يستطيع أن يعدى بها عدداً كبيراً من الفيروسات، ولذلك فإن مقاومة هذه الحشرات وقتلها أثناء تغذيتها الأولى يكون مجديا، ويؤثر بشكل ملحوظ فى الحد من انتشار مثل تلك الفيروسات.

أما بالنسبة لانتشار الفيروس داخل الحقل نفسه.. فإن العوامل السابق ذكرها نفسها تؤثر التأثير السابق ذكره نفسه، حيث إنه فى حالة الفيروسات الدوارة (الداخلية) فإن الحشرة تتغذى فترة طويلة على النبات المصاب، ولذا فإن استخدام المبيدات يكون مجديا عن تلك التى تنقل على أجزاء فم الحشرة (خارجية Stylet - borne viruses).

وقد وجد برت Burt سنة ١٩٦٤ هذا الاختلاف عند دراسة تأثير اثنين من المبيدات الجهازية على انتشار فيروسين من فيروسات البطاطس؛ حيث أمكن الحد من انتشار فيروس التفاف أوراق البطاطس، وهو فيروس من الفيروسات الباقية، بينما لم تؤد المعاملة بهذين المبيدين إلى أى تأثير على انتشار فيروس Y البطاطس، وهو أحد الفيروسات غير الباقية (الخارجية).

وحتى يمكن تحديد الوقت الذى يتم فيه أكبر انتشار لفيروس التفاف الأوراق على

البطاطس فى إنجلترا، أجرى برت Burt تجارب على معاملة الزراعات بالمبيدات الجهازية فى فترات مختلفة من مراحل نمو النباتات. وقد اتضح من نتائج هذه التجارب أن الوقت الفعال فى نشر هذا الفيروس هو هجرة المن المجنح فى أول موسم النمو الخضرى، ولذلك يوصى برت Burt بإجراء المعاملة بالمبيد الجهازى مبكراً بقدر الإمكان.

كما هو الحال بالنسبة لفيروس Y البطاطس، فإن فيروسات أخرى غير باقية مثل فيروس موزايك خس اللاتوكا لم تؤثر المعاملة بالمبيدات الجهازية أى تأثير فى خفض نسبة الإصابة بها. إلا أن الرش بالمبيدات له بعض جوانبه السلبية؛ حيث إن ذلك يعتبر عملية إضافية تعرض النباتات للتلف بفعل الجرارات أو الات الرش، ولهذا فإنه فى كثير من الأحيان لا يمكن إجراء عملية الرش فى الوقت اللازم أو الأكثر مناسبة لإجرائها. ومن ناحية أخرى فإنه عند إجراء عملية الرش من الممكن أن يحمل المبيد بفعل الرياح ويتلف محاصيل أخرى. إلا أن السلبيات السابق ذكرها يمكن استبعادها فى حالة استعمال المبيدات الجهازية المحببة (Granules) حيث يمكن وضعها فى التربة وقت الزراعة. وعند زراعة البطاطس من الممكن وضع الكمية المناسبة من المحببات بمساعدة آلة خاصة تضاف الى ماكينة زراعة البطاطس، وقد أعطت مثل هذه المحببات تأثيرا لا بأس به فى خفض انتشار فيروس التفاف أوراق البطاطس.

ويعتبر الداى سولفاتون Disulphaton والفورات Phorat من المبيدات الجهازية المحببة، التى تعطى نتائج جيدة فى مقاومة حشرات المن. وحيث إنها بطيئة الذوبان فى الماء فإنهما يظلان بالتربة فترة طويلة، ولذلك تقوم النباتات بامتصاصها على مدى فترة طويلة، وقد وجد أن هذين المبيدين يقيان البطاطس من المن لمدة لا تقل عن عشرة أسابيع بعد الزراعة. وفى بعض التجارب وجد أنه على مدى ٥٥ ـ ٦٥ يوماً من الزراعة وجدت حوالى من ١٣٠٠ ـ ٣٥٠٠ فرد من المن على أوراق النبات غير المعامل، بينما كانت أعداد المن على النباتات المعاملة من ١٠ ـ ١٥ فرداً. ولقد أدت مثل هذه العملية إلى خفض انتشار فيروس التفاف أوراق البطاطس من النباتات المصابة الى السليمة. إلا أنه يجب أن نذكر أن مثل هذه المبيدات الجهازية المحببة لا تعطى نتائج إيجابية باستمرار، فعلى سبيل المثال عند معاملة

البسلة بمثل هذه المبيدات أصبحت النباتات سامة بالنسبة للمن، ولكن هذه المعاملة لم تنجح فى خفض نسبة الإصابة بفيروس موزايك البسلة العادى وفيروس تشوه البسلة وهو فيروس باق.

ويجب أن يشار إلى أن استخدام المبيدات غير المناسبة يؤدى إلى رفع نسبة الإصابة بالفيروسات، وذلك إما لإنها تقتل المفترسات التى تتغذى على المن أو لتأثيرها المباشر على النباتات. وفى سنة ١٩٦٤ وجد .Broabent et al أنه عند رش النرجس أو تعفيره بواسطة الـ D.D.T أو أحد المركبات الفوسفورية أدى إلى زيادة انتشار فيروس الاصفرار المخطط بصورة أكثر من انتشاره فى الزراعات غير المعاملة؛ حيث نشطت بعد المعاملة حشرات المن المجنح، بينما لم تتأثر أعداد المن غير المجنح.

وكذلك الحال فى حالة فيروس اصفرار بنجر السكر؛ حيث تزداد نسبة الإصابة به، عندما تعامل النباتات بمادة الـ D. D. T أو الترای كلوروفون Trichlorophon، إلا أن استخدام المبيدات العضوية الفوسفورية أدى إلى خفض نسبة الإصابة به لحد ما بواسطة المن خلال المزرعة نفسها. وتتوقف القيمة الاقتصادية للرش على الوقت ودرجة انتشار الفيروس فى مزرعة ما.

ففى إنجلترا وجد أن المعاملة خلال شهر يونيو تؤدى إلى زيادة المحصول فى حالة ما إذا كانت نسبة الإصابة فى الحقول غير المعاملة أكثر من ٢٠٪ . ولذلك فإن إجراء الرش الوقائى بواسطة الزراع الإنجليز تتحدد أساساً على الحصر السنوى للمن، الذى يتغذى على محصول ما. ولذلك فإن الزراع يجدون ظهور عدد فرد واحد من المن على كل ٤ نباتات، تحذيراً لهم فيقومون بإجراء عمليات الرش بالمبيدات.

ومن العوامل المؤثرة فى نجاح عملية المقاومة بالمبيدات هو وقت إجراء الرش، ومن سنة ١٩٦٢ حتى سنة ١٩٦٦ حيث كان يجرى الرش على أساس أعداد المن، أدى إلى خفض نسبة الإصابة بفيروس الاصفرار بنسبة ٣٧٪، وإذا تم إجراء الرش مبكرا أو متأخرا عن تلك المواعيد بمدة أسبوعين فإن معدل الانخفاض فى الإصابة لم يتجاوز ٢٥٪.

وفى حالة فيروس التقزم الأصفر فى الشعير الذى يعتبر الفيروس الأساسى الذى يصيب

القمح فى نيوزيلنده، وجد أن هناك فترتين لانتشار الفيروس على زراعات هذا المحصول: الفترة الأولى فى الربيع «مايو» حينما ينقل المن المجنح العدوى من الخارج، حيث لا يوجد إلا عدد قليل من المن تقضى الشتاء على الزراعات، بينما تأتى الفترة الثانية لانتشار الفيروس حينما يبدأ تكاثر المن على المحصول، ويقوم بنشره داخل المزرعة نفسها، ويكون ذلك فى الخريف خلال سبتمبر ونوفمبر.

وعند اتباع نظام الرش على أساس إعداد المن، فيجب إجراء الرش فى هذه المواعيد، وهذا الفارق الكبير من يونيو وسبتمبر يعطى فرصة أكبر لاختيار مواعيد الرش بصورة أفضل وأسهل منه فى حالة زراعة بنجر السكر فى أوروبا حيث الفترة قصيرة.

ب ـ الرش بالمعلقات الزيتية:

لقد وجد أنه بعد أن قامت أفراد من المن الحامل للفيروس من وخز أغشية شمعية، انخفضت قدرتها بشكل ملحوظ على نقل فيروس Y البطاطس، وكان من الواضح أن هذا الانخفاض لم يكن للشمع فيه دخل، وإنما للمادة الزيتية الموجودة به، وقد أظهرت مواد زيتية أخرى التأثير نفسه.

ولقد أدت مثل هذه التجارب الى وضع الأساس لاستخدام الرش بالمعلقات الزيتية، كإحدى وسائل مقاومة أو الحد من انتشار الفيروسات النباتية بواسطة المن. ومن الصعوبات التى واجهت استخدام مثل هذه الطريقة هو سمية مثل هذه المعلقات على النباتات، وأيضا كان من الصعب تغطية النباتات تمامًا بواسطة المعلق الزيتى تغطية متجانسة، بما فى ذلك الأسطح السفلى للأوراق أيضا.

وقد قام Loebensten et al سنة ١٩٦٤ بإجراء تجارب فى الصوب الزجاجية، ووجدوا أن رش الخيار بمعلق مائى ١٪ من الزيت المناسب، مع إضافة مادة ناشرة قد أدت إلى وقاية نباتات الخيار من الإصابة بفيروس موزايك الخيار، الذى ينتشر بواسطة حشرات من القطن *Aphis gossypii*. وبعد ذلك وجد Loebensten ومساعدوه أن الرش بالمعلقات الزيتية يؤدى إلى خفض نسبة انتشار فيروس موزايك الخيار، وأنها تعطى نتائج إيجابية أيضا على المحصول لو كانت الإصابة تحدث فى أول الموسم؛ حيث إن نمو النباتات غير المعاملة قد تأثر

بشدة نتيجة الإصابة ولم ينتج عن استعمال هذه المعلقات أى تأثير ضار على النباتات خصوصا فى ظروف الرى بالرش.

وأغلب التجارب التى أجريت على مدى إمكانية استخدام المعلقات الزيتية فى الرش الوقائى ضد الفيروسات أجريت على الفيروسات المحمولة على الإبر الفكية، ولكن وجدت نتائج إيجابية أيضا مع بعض الفيروسات الأخرى مثل فيروس اصفرار بنجر السكر Sugar beet yellows.

وبعض الزيوت لها تأثير متخصص فزيت الذرة مثلاً يمنع نشر فيروس موزايك بنجر السكر بواسطة من الخوخ الأخضر *M.persicae* ، ولكنها لاتؤثر على نقل فيروس اصفرار بنجر السكر. ولم يزل إلى الآن غير واضح ميكانيكية تأثير المعلقات الزيتية على نقل الفيروسات بواسطة المن. إلا أنه وجد أن الزيوت التى يحتوى الجزئ منها على ١٦ أو أقل من ذرات الكربون تكون غير فعالة، وقد يرجع ذلك إلى قابليتها للتطاير. وإلى جانب ذلك فإن رش النباتات بالمعلقات الزيتية يجعل من الصعب على حشرات المن أن تكتسب الفيروس؛ حيث وجد أنه فى ظروف معينة أن رش النباتات المصابة والسليمة بالمعلقات الزيتية يؤدى إلى خفض نسبة الإصابة الفيروسية الواردة من الخارج.

ويعرف حتى الآن أكثر من عشرة فيروسات من مجموع ١٠٠ فيروس، تنتقل على الإبر الفكية للمن تجدى معها طريقة الرش بالمعلقات الزيتية. وهذه المعاملة تعتبر اقتصادية فى حالة الفيروسات التى تسبب خسائر سنوية كبيرة فى المحصول. وتتفوق المعلقات الزيتية على المبيدات الحشرية فى أن الأولى لا تعتبر سامة بالنسبة للحيوانات أو الإنسان.

جـ - المقاومة غير الكيماوية للحشرات الناقلة:

لقد اختبر عديد من الوسائل التى تعمل كسياج، يمنع الحشرات الناقلة من الوصول إلى محصول ما أو إزعاجها. ففى بعض الأحيان تحمى النباتات الطويلة أو العالية النباتات الصغيرة من الإصابة بالحشرات وبالتالى الفيروسات. وهذا ما يحدث عند زراعة الذرة مع الكوسة فى مكان واحد. وقد وجد أن هذه المحاصيل الواقية او السياجية تلعب دوراً مهمًا فى

ظروف معينة فى خفض نسبة الإصابة بالإمراض الفيروسية، فقد وجد Broabent سنة ١٩٥٧ أنه إذا ما زرع حول الكرنب عدة خطوط من الشعير ضيق الأوراق؛ بحيث تكون المسافة بين كل خط وآخر ٣٠ سم فإن نسبة الإصابة بالفيروس فى حقل الكرنب تنخفض بنسبة ٢٠٪ ومن المعروف أن الشعير لا يصاب بالفيروسات التى تصيب الصليبيات.

وهنا فإن عدداً كبيراً من المن القادم من خارج المزرعة يهبط على الشعير «المحصول الواقى» وتحاول ان تتغذى عليه أو تطير مرة أخرى، فلو هبطت بعضها على الكرنب فإنها تكون لحد كبير فقدت أى فيروس غير باقٍ أى محمول على الإبر الفكية، عند بداية تغذيتها على الشعير.

وقد وجد Nitzany سنة ١٩٦٤ أن بعض النباتات العشبية فى وادى الأردن من الممكن أن تحمى الخيار من الإصابة بفيروس موزايك القرع العسلى الذى ينتقل بواسطة الذباب الأبيض. وقد وجد أن استخدام هذه النباتات حول وبين مزرعة الخيار يؤدى إلى خفض نسبة الإصابة بهذا الفيروس بدرجة ملحوظة، كما زاد المحصول زيادة كبيرة.

كما توجد بعض المعلومات التى تشير الى استخدام اشرطة الالمونيوم لحماية بعض الزراعات من المن الناقل للفيروسات؛ حيث يعتقد أن الحشرات التى تقترب من هذا الحقل تزعجها الأشعة فوق البنفسجية التى تعكسها مثل هذه الأشرطة. وعلى حد قول Smith سنة ١٩٦٤ أنه عند وضع هذه الأشرطة على خطوط وسط الجلاديولس، انخفضت أعداد المن بما يوازى ٩٥٪، كما انخفضت نسبة الإصابة بفيروس موزايك الخيار إلى حوالى الثلث.

ومن ناحية أخرى عندما استخدمت هذه الوسيلة لحماية الشمام، لم تؤد إلا إلى تأخير ظهور الأعراض لفيروس موزايك البطيخ، كما استخدمت هذه الطريقة لإنتاج أنواع عالية القيمة من الكريزانثيم ولكن دون جدوى.

د ـ وقاية النبات باستخدام المفترسات وطفيليات الحشرات:

من المعروف أو من غير المشكوك فيه أن المفترسات والطفيليات تلعب دوراً كبيراً فى الحد من أعداد المن. وفى بعض الأحيان يؤدى ظهور المفترسات إلى الحد من انتشار فيرس ما إذا

ظهرت قبل الهجرة الأولى للمن؛ حيث إن الفترة الأولى هى أهم فترة لانتشار الفيروس، ومع ذلك فإنه عادة ما يكون تأثير مثل تلك المفترسات غير كبير.

إلا أن Stubbs سنة ١٩٥٦ يرى أن فيروس التقزم المخطط فى الجزر الذى يظهر بصورة وبائية فى أستراليا لا يسبب مثل هذا الضرر فى كاليفورنيا، ويعزى ذلك إلى وجود بعض المفترسات التى تفترس حشرات المن *Cavariella aegopodii* ، بينما لا توجد مثل هذه المفترسات فى أستراليا. ومنذ وقت قريب قاموا بجلب أحد هذه المفترسات الى ولاية ملبورن؛ مما أدى إلى اختفاء المن، وأصبح هذا المرض لا يسبب خسائر كبيرة فى الولاية.

ثانيا: النيماتودا الناقلة:

عند معاملة التربة بالمبيدات النيماتودية يجب أن يوضع فى الاعتبار وقاية النباتات من الفيروسات التى تنتشر بواسطة حيوانات النيماتودا. وحيث إن تحرك وانتشار النيماتودا يحدث عادة ببطء فانه يجب أن يوضع فى الاعتبار أن تأثير هذه أو تلك من المعاملات يجب أن يستمر لفترة أطول من فترة تأثير المبيدات الحشرية. ومن ناحية أخرى كما يقول Sol سنة ١٩٦٣ إن النيماتودا الحاملة للفيروس من الممكن أن توجد على أعماق كبيرة فى التربة قد تصل الى ٨٠ ـ ١٠٠ سم. وبالتالى فمن الممكن جدا ان تتلوث التربة المعاملة مرة أخرى عن طريق النيماتودا القادمة إليها من الاعماق؛ أى من تلك الأماكن التى لم يصل إليها تأثير المبيد أو حيث هاجرت واختبأت بها حتى لا يصل إليها تأثير التدخين.

وقد أجرى Harrison et al سنة ١٩٦٣ تجارب حقلية فى بعض المناطق فى جنوب إنجلترا وأوضحوا أن نتائج المعاملة الصيفية للتربة بواسطة داى كلوروبروبان داى كلوروبروبين «D.D» أو ميثايل بروميد بمعدل ١٠٠٠ كم للهكتار أدى إلى موت أكثر من ٩٩٪ من النيماتودا *X. diversicaudatum* الموجودة فى التربة. كما أدت المعاملة إلى خفض نسبة إصابة الشليك بفيروس موزايك الأرابيس Arabes mosaic virus. وكان الشليك قد زرع بعد التدخين وفحصت خلال ١-٣ سنوات. وعند استخدام المبيدين المذكورين لوحظ موت النيماتودا حتى عمق ٧٠ سم، وهو أكبر عمق أخذت عنده العينات. وقد لوحظ أن هناك علاقة طردية بين نسبة الإصابة فى النباتات المزروعة فى المناطق المعاملة بالتدخين، وبين

أعداد النيماتودا التى تظل نشطة. فقد وجد أن حينما قتل ٩٩٪ من النيماتودا تنخفض نسبة الإصابة بنسبة ٩٧٪، وعندما قتل ٩٠٪ من النيماتودا، تنخفض نسبة الإصابة بمعدل ٦٥٪، ويجب أن يراعى أن تجرى عملية تدخين التربة مرة واحدة كل عدة سنوات؛ حيث وجد Taylor و Murdnt سنة ١٩٥٦ أن تدخين التربة مرة واحدة بواسطة D.D أو بنتاكلورونيتروبنزين BCNP، تحمى تماما الشليك من الإصابة بفيروس النقط الحلقية السوداء فى الطماطم، وفيروس التنقط الحلقى فى الشليك الأمريكى، وهذين الفيروسين ينتقلان بواسطة نيماتودا *L.elongatus* ، وكان أفضل المبيدات هو المبيد BCNP حيث إنه لم يحدث أى تأثير على نمو النباتات، ولأنه لوحظ أن المعاملة بمبيد D.D تؤدى إلى زيادة حساسية النباتات للإصابة بفطر Botrytis فى الأوقات الرطبة؛ وحيث إن نيماتودا *Longidorus elongatus* ذات مجال عوائلى واسع للغاية من بين النباتات المزروعة والبرية، فإنه لا يمكن مقاومتها باتباع الدورة الزراعية فقط، حتى إذا تركت الأرض بوراً فإن هذه النيماتودا من الممكن أن تعيش فترة طويلة فى التربة دون أن يتوفر لها الغذاء. ولا يمكن تخليص التربة من هذه النيماتودا إلا باستخدام المبيدات النيماتودية، ولذلك فطريقة المقاومة الكيماوية هى الوحيدة، التى يمكن استخدامها فى مقاومة الفيروسات التى تنتشر بواسطة هذا النوع من النيماتودا، ولكن الثمن المرتفع لمثل هذه المبيدات يحد كثيراً من استخدامها، ومن الممكن استخدامها بصورة اقتصادية فى محاصيل معينة خصوصاً أشجار الفاكهه.

ثالثاً: الفطريات:

لقد وجد أنه عند زراعة الخس العادى فى الصوب أن نسبة الإصابة بفيروس العرق الكبير Big vein of lettuce تنخفض بدرجة ملحوظة، إذا ما دخنت التربة قبل الزراعة بمخلوط من الكلوروبكرين و D.D.C، وقد أجريت فى الحقل تجارب ناجحة لحد ما للتخلص من فطر *Olpidium*، وهو الفطر الناقل لهذا الفيروس. وقد وجد Mckittrlck وMarial سنة ١٩٦٤ أنه عند معاملة المساحات المزروعة بواسطة BCNP بمعدل ٨٠كم هكتار، فإن اصابة نباتات الخس بفيروس العرق الكبير تنخفض الى النصف، وقد امتد تأثير هذه المعاملة لمدة عامين إلا

أن نضج النباتات تأخر بعض الشيء.

رابعاً : الإنسان:

يعتبر الإنسان هو الناقل الإساسى لبعض الفيروسات، خصوصا تلك التى تنتقل ميكانيكيا مثل فيروس TMV أثناء عملياته الزراعية والعناية بمحصوله، فلو كانت نباتات مثل الدخان والطماطم مصابة فعلا بفيروس TMV فيكون من الصعب جدا الحد من انتشاره خصوصا عند تزاحم النباتات وتلامسها. وينصح الزراع باتخاذ بعض الاحتياطات أثناء إجراء عملياتهم الزراعية، وذلك بغسل وتطهير الأيدى، ويستخدم لهذا الغرض محلول ٣٪ اورثوفوسفات الصوديوم . ويرى Malholland سنة ١٩٦٢ أنه إذا ما استخدمت سكاكين خاصة فى تقطيع النباتات أو حشها، فإنه يمكن الحد من انتشار فيروس TMV بدرجة ملموسة، وهذه السكين تكون مزودة بيد منتفخة من البلاستيك تملأ بمحلول ١٠٪ فوسفات الصوديوم، مع إضافة مادة منظفة ووقت العمل فإن المحلول ينساب ببطء على حد السكين. كما أن ملابس العمل تلوث بشدة بفيروس TMV ، ومنها ينتشر الفيروس عند تلامس الملابس الملوثة مع النباتات السليمة.

كما يمكن للفيروس أن يعيش طويلا على الملابس المحفوظة فى الأماكن المظلمة المقفلة لمدة حوالى ثلاث سنوات. ولكن إذا ما وضعت هذه الملابس تحت أشعة الشمس فإنه يفقد حيويته خلال بضع أسابيع. وعلى العموم فإن التطهير التام للملابس يتم باستعمال الغسيل على الناشف (البخار)، أو وضعها فى إناء يغلى مع وضع منظف أو مطهر. ويعتبر فيروس TMV من أثبت الفيروسات التى تنتقل ميكانيكيا، ومع ذلك توجد فيروسات أخرى أقل منه ثباتًا، وتنتقل على سكين التقطيع التى تستخدم فى قطع أوتقليم النباتات، وبهذه الطريقة ينتشر فيروس تبرقش التيوليب وفيروس X البطاطس، وفيرويد الدرنات المغزلية فى البطاطس وبعض فيروسات الجلاديولس.

استخدام الأصناف المنيعة أو المقاومة:

بالنسبة للحيوانات الراقية فإنه يترتب على شفاء الحيوان من المرض الفيروسى ، أنه

يكتسب مناعة ضد العدوى بهذا الفيروس لفترة قد تطول أو تقصر، وفى هذه الحالة يشترك نوعان من الأنظمة الدفاعية. فى المراحل الأولية للعدوى ينشط فى الخلية المصابة تمثيل البروتين ذى الوزن الجزيئى المرتفع، والذى يملك القدرة على إيقاف تضاعف الفيروس ويعرف هذا البروتين بأسم انترفيرون Interferon، والذى ينتج بناء على شفرة من جينات الخلية وفى المراحل المتأخرة من العدوى يتم تمثيل وإنتاج الأجسام المضادة، وهى أجسام متخصصة ضد المسبب المرضى الذى دخل إلى الجسم. وهذه الأجسام المضادة Antibodies هى بعينها التى تؤدى إلى شفاء الحيوان، بل واكتسابه للمناعة ضد العدوى التالية بالمسبب المرضى نفسه.

ولقد أظهرت الدراسات الحديثة التى تناولت تشكيلات مختلفة من العوائل النباتية والفيروسات التى تسبب ظهور النقط الموضعية Local Lesions أنه لدى بعض النباتات القدرة على تمثيل مواد ما، لها القدرة على تثبيط قدرة الفيروس على التزايد العدوى. ويرى البعض أن هذه المواد من حيث بعض الصفات متشابهة مع الانترفيرون السابق الإشارة إليه فى الحيوانات التى تصاب بالفيروسات. إلا أنه الى الآن لم يمكن إثبات وجود خط الدفاع الثانى الذى يشابه الأجسام المضادة فى الحيوانات. وهذا ما يفسر بقاء الفيروس نشطًا فى الخلايا النباتية حتى نهاية حياة هذه النباتات على عكس الحيوانات، التى يختفى منها الفيروس بمجرد الشفاء.

ويمكن للنباتات أن تكتسب مقاومة ضد العدوى الثانية للفيروس نفسه، أو إحدى سلالاته بطريقتين، وأولى هذه الطرق قد يرجع إلى أن الفيروس يوجد فى جميع أعضاء النبات أو أغلبها، وبهذا فهو يمنع دخول أو يقاوم دخول السلالات الاخرى من هذا الفيروس، وهذا المظهر يطلق عليه Non Sterile acquired resistance – أما الطريق الثانى للمناعة أو المقاومة المكتسبة فى النباتات، فينحصر فى أنه يصاب أحد أجزاء النبات بفيروس ما إن الأجزاء سواء البعيدة أو القريبة من العضو المصاب تكتسب مناعة ضد الإصابة للفيروس نفسه، والسلالات القريبة له، وقد تكتسب مناعة أيضًا ضد فيروسات أخرى قريبة للفيروس المعدى، ويطلق على هذا المظهر اسم Sterile acquired resistance.

ولقد وجد Yarwood سنة ١٩٥١ وسنة ١٩٦٢ المظهر التالى: إذا لقحت أوراق الفاصوليا بفيروس TMV فإنه بعد ثلاثة أيام لو أعيد تلقيح الأوراق بهذا الفيروس نفسه.. فإن النقط المحلية التى تظهر نتيجة للعدوى الثانية، تكون متباعدة عن النقط المحلية التى تكون قد ظهرت نتيجة للتلقيح الأول، وقد درس هذا النوع من المقاومة المكتسبة بواسطة Ross ومساعديه سنة ١٩٦٣ عند إصابة نباتات الدخان من صنف سمسون بواسطة فيروس TMV ، وكذا عند إصابة الفاصوليا صنف بنتو بواسطة فيروس نيكروزيس الدخان . Tob necrosis. وفى التجارب التى أجريت على الدخان فإنه عند تلقيح الأوراق السفلى وبعد مضى عدة أيام أعيد تلقيح الأوراق نفسها، وكذا الأوراق العليا بالفيروس نفسه، وقد تم الحكم على المقاومة المكتسبة بصغر قطر النقط المحلية، وفى أحيان أخرى بعدد النقط الموضعية. وبالنسبة للفاصوليا تم تلقيح إحدى الورقتين الأوليتين، وبعد عدة أيام تم تلقيح الورقة المقابلة لها.

ولقد أوضح Ross أنه فى منطقة قطرها ١-٢ مم حول النقطة الموضعية، التى يسببها فيروس TMV على أوراق الدخان من صنف سمبسون تظهر مقاومة عالية لهذا الفيروس. وقد اتسع نطاق هذه المنطقة وزادت مقاومتها فى غضون الأيام الستة التالية للتلقيح، كما ظهرت أعلى مقاومة لدى النباتات التى زرعت عند درجة حرارة تتراوح بين ٢٠ - ٢٤°م، ولم تلاحظ أى مقاومة مكتسبة عند درجة حرارة ٣٠°م. كما وجد Ross أنه عند تلقيح أوراق الدخان بفيروس S البطاطس، وإعادة تلقيحها بفيروس X البطاطس، لم تظهر أى نقط محلية، ومعنى ذلك أن الإصابة بفيروس تعطى أيضًا مناعة لفيروس آخر غير قريب أو غير شقيق، إلا أن هذا النوع من المقاومة المكتسبة غير متخصص بالنسبة للفيروس، فعلى سبيل المثال المناطق المحيطة بالنقط الموضعية المتسببة عن فيروس TMV كانت مقاومة لفيروس نيكروزيس الدخان Tob. Necrosis وكذلك بالنسبة لفيروسات أخرى، إلا أنها لم تكن كذلك بالنسبة لفيروس موزايك اللفت.

وقد أولى Ross سنة ١٩٦٤ أهمية خاصة لمناطق المقاومة التى تظهر على مسافة معينة من النقط الموضعية؛ حيث إن المقاومة لم تظهر فقط فى الأجزاء غير الملقحة، ولكنها ظهرت أيضًا فى الأوراق الأخرى على النبات نفسه؛ حيث كان قطر النقط الموضعية فى هذه الحالة

بمثل $\frac{1}{2}$ قطرها على أوراق المقارنة. إلا أن عدد النقط على أوراق الدخان من صنف سمسون الملقحة بفيروس TMV لم يتغير، ويرى Ross أن المقاومة قد اكتسبت فى غضون ٢-٣ أيام، وتصل إلى الحد الأقصى فى اليوم السابع، واحتفظ النبات بها لمدة ٢٠ يومًا بعد العدوى. أما الأوراق التى ظهرت بها المقاومة، فكانت خالية من الفيروس قبل بداية العدوى الثانية، إلا أنه لم يتوصل أحد حتى الآن إلى اكتساب النبات المناعة أو المقاومة المطلقة. وعند درجة حرارة ٣٠°م فإنه لا يلاحظ أى أثر للمقاومة المكتسبة، كما أن هذه المقاومة لا تظهر فى حالة التلف الميكانيكى أو الكيماوى الذى يؤدى إلى موت الخلايا ولا حتى فى حالة الإصابة بالفيروسات التى لا تسبب ظهور نقط موضعية.

ولقد أدى تلقيح نباتات الدخان بفيروس موزايك الدخان TMV إلى إكساب النباتات مقاومة لهذا الفيروس، وكذا لفيروس نيكروزيس الدخان وبعض الفيروسات الأخرى.

كما ظهرت أيضا مقاومة مكتسبة غير متخصصة عند ظهور نقط محلية على نباتات الفاصوليا والبسلة وقد وجد Lobstein مظهراً للمقاومة المكتسبة الجهازية فى نباتات الداتورة التى لقحت بفيروس موزايك الدخان، وفى نباتات المدنة ***G. globosa*** الملقحة بفيروس X البطاطس، وكلاهما ظهرت عليه نقط موضعية، وفى الحالتين عند تلقيح الأوراق الأخرى قل عدد النقط المحلية بشكل ملحوظ عند تلقيحها بالفيروسات نفسها. وعند معاملة الفيروس بمستخلص هذه الأوراق انخفضت قدرتها على العدوى أيضا بشكل ملحوظ.

ووصل روس الى خلاصة تنحصر فى أن تأثير العدوى الأولى على عدد النقط المحلية (الموضعية) يظهر متأخراً ويتراوح هذا التأثير فى حدود واسعة. ويرى روس أيضًا أن انخفاض عدد النقط المحلية يرجع إلى أنه على الأوراق التى اكتسبت مقاومة، يكون قطر النقط الموضعية صغيرا جدا بدرجة، لا تسمح برؤيتها أوحصرها وبالتالى يقل عددها.

ويعتقد أن ظهور المقاومة المكتسبة الجهازية يتوقف على انتشار مادة ما أو مواد فى أنسجة النبات الملقح بفيروس ما. ولقد أجرى روس تجارب مكثفة لإثبات ذلك.. فقد قام بقطع العرق الوسطى للورقة العليا لنبات الدخان، وقد وجد أن أجزاء الورقة التى تلى هذا الجزء لا تظهر أى مقاومة نتيجة لتلقيح الجزء العلوى.

وسوف نتكلم فيما بعد عن العوامل الوراثية التى تحدد المقاومة والمناعة أو الحساسية، عند النباتات للعدوى فإن إدخال جينات المقاومة إلى نباتات أصناف معينة، ثم توالى إكثار النباتات المنيعة أو المقاومة بعد ذلك يعتبر من أهم وسائل مقاومة الأمراض الفيروسية، وقد عملت محاولات لهذا الغرض لمقاومة مختلف الأمراض النباتية. وعلى الرغم من أن جينات المقاومة أو المناعة يمكن إظهارها عادة وبسهولة لحد ما، إلا أنه من الصعب نقل هذه الجينات إلى نباتات الأصناف المرغوبة. وأحيانًا يلاحظ أن نباتًا ما منيعًا لفيروس ما، على الرغم من أن جميع الأصناف تكون حساسة لهذا الفيروس . فعلى سبيل المثال فإن بادرات البطاطس من صنف USDA 41956 تعتبر منيعة لفيروس x البطاطس . كما أن بعض أصناف الشليك وجدت منيعة لأخطر الفيروسات التى تنتقل عن طريق التربة.

ولقد توجت بعض الأعمال التى أجريت لإنتاج الأصناف المقاومة للفيروسات بنجاح كبير، فلقد كان فيروس موزايك قصب السكر من أهم الفيروسات المحددة لإنتاج هذا المحصول، حتى أمكن إنتاج الأصناف المقاومة. P. O.J ، والتى على أساسها أمكن إنتاج أصناف جديدة مقاومة (Summers et al 1964) ، وفى الوقت نفسه لم يتمكن Russell سنة ١٩٦٠ من الحصول على أى نبات مقاوم لفيروس اصفرار بنجر السكر من بين ١٠٠,٠٠٠ نبات قام بفحصها. ولكنه عاد مؤخرًا وأعلن أنه تمكن من العثور على بعض النباتات المقاومة لهذا الفيروس من بين السلالات المتحملة Tolerant من هذا المحصول سنة ١٩٦٦.

وأحيانًا ما تظهر المقاومة الحقلية Field resistance على بعض الأصناف ذات الحساسية المفرطة للعدوى Hypersensitive؛ حيث فى هذه الحالة تظهر على النباتات نقط محلية Local Lesions ، ولكن العدوى الجهازية لا تظهر. فعلى سبيل المثال وجد أن بعض السلالات من نباتات الدخان *N.tabacum* تعطى نقطا محلية عند عدواها بفيروس موزايك الدخان، ويعتبر هذا هو التفاعل المميز لهذا الفيروس مع *N. glutinosa* كما نعرف. ويجب أن نشير إلى أن المقاومة الحقلية فى هذا أو ذاك من المحاصيل، من الممكن أن تتسبب عن مرت النباتات الفردية التى تصاب بالفيروس، وينتج عن ذلك استبعاد مصدر العدوى داخل الحقل.

وإذا تعذر إيجاد الأصناف المقاومة أو المنيعة لهذا الفيروس أو ذاك من بين العوائل النباتية، فإنه فى هذه الحالة يلجأ الباحثون إلى البحث عن الأصناف المتحملة Tolerant لفيروسات معينة، وقد أمكن التوصل إلى أكثر من ٣٠ نوعًا من النباتات المزروعة، والتى تعتبر متحملة لفيروسات محددة.. إلا أنه يجب أن يكون معروفا أن اللجوء إلى مثل هذه الاصناف يعطى نتائج أقل بكثير من النتائج المطلوبة لحل المشكلة أو المقاومة من تلك النباتات، التى تملك جينات المقاومة أو المناعة، وهناك عدة أسباب لذلك، منها :

١ - أن قابلية الأصناف المتحملة للعدوى يجعلها مصدراً للعدوى، ينتقل منه الفيروس إلى النباتات الأخرى الحساسة، ولذلك فإن الجمع بين العوائل المتحملة والحساسة لفيروس فى منطقة واحدة يسهل انتشار الفيروس فى المنطقة، ويعطى نتائج غير مرغوبة.

٢ - الانتشار الواسع للفيروس بين النباتات أثناء الموسم يؤدى إلى زيادة عدد النباتات المصابة بالفيروس؛ مما يجعل من السهل ظهور سلالات من الفيروس تلغى تأثير التحمل.

٣ - تؤدى العدوى الفيروسية إلى زيادة حساسية النباتات للإصابة بالفطريات، ومع ذلك فإن الأصناف المتحملة تعطى محصولاً أكبر إذا ما قورنت بالأصناف الحساسة فى حالة ما إذا كانت الإصابة الفيروسية تؤدى إلى خسائر كبيرة فى الظروف العادية، وإذا ما وجد بين النباتات كثير من مصادر العدوى التى يصعب إزالتها. كما يمكن استخدام الاصناف المتحملة بنجاح إذا ما كان المحصول من بين المحاصيل الحولية مع استخدام تقاوٍ خالية من الفيروس عند الزراعة. فعلى سبيل المثال تعتمد زراعة بنجر السكر فى كاليفورنيا على استخدام الأصناف المتحملة لفيروس تجعد القمة. كما تستخدم بنجاح أصناف الشعير المقاومة لفيروس التقزم الاصفر، وكذا تستخدم أصناف القطن الأكثر تحملاً لفيروس تجعد الأوراق.

وتتوقف حالة بعض الأصناف فى الحقل على ما إذا كانت هذه أو تلك من الأصناف التى تعتبر جاذبة أو غير جاذبة للحشرات الناقلة. فإذا ما زرعت أصناف مختلفة من محصول ما

فى ظروف متشابهة توجد بها نسبة إصابة مختلفة بفيروس ما، فقد يكون ذلك راجعًا الى أن بعض تلك الأصناف يكون أكثر جذبًا للحشرات من غيرها. ولذلك فإنه تحت ظروف الحقل لا يمكن التمييز ما بين الأصناف من حيث هل أن الصنف مقاوم أو حساس للفيروس، أو أنه أقل أو أكثر جذبًا للحشرات الناقلة.

وتنحصر الصعوبة الأساسية فى إنتاج الأصناف المقاومة للفيروسات فى إمكان ظهور سلالات جديدة من الفيروس، أو حتى الناقل الحشرى الذى تعتبر هذه الأصناف حساسة له.

ويرى Giddings سنة ١٩٤٧ أن أصناف بنجر السكر التى كانت سابقًا مقاومة لفيروس تجعد القمة Curly top فقدت هذه الصفة بعد ذلك.

كما أن الأصناف المقاومة أو ذات الحساسية المفرطة لفيروس ما فى منطقة ما من الممكن أن تكون حساسة لسلالات أخرى من هذا الفيروس تنتشر فى مناطق أخرى، ولقد وجد Hutton سنة ١٩٤٨ أن بعض سلالات البطاطس كانت ذات حساسية مفرطة؛ أى تعطى نقطًا محلية لفيروس x المنتشر فى أستراليا، وعندما نقلت إلى إنجلترا فقدت هذه الخاصية.

ويعتقد أن جين L الذى اكتشف فى نباتات الفلفل يحمى هذا المحصول من الإصابة الجهازية بجميع سلالات فيروس موزايك الدخان، إلا أن .Greenleaf et al سنة ١٩٦٤ وجد أن إحدى سلالات فيروس موزايك الدخان تصيب هذا أو تلك من أصناف الفلفل، إصابة جهازية مع أنها تحمل هذا الجين.

كما تزداد الصعوبة عند انتخاب الأصناف المقاومة إذا ما كان الانتخاب يستهدف سلالات عديدة وليس سلالة واحدة، وكذلك ضد فيروسات عديدة وليس فيروسًا واحدًا.

وتظهر مشكلة السلالات الفيروسية فى عملية انتخاب الأصناف المقاومة فى التجارب التى قام بإجرائها Rast سنة ١٩٦٧، فقد قام بعدوى ٣٠ سلالة من نباتات *Lycopersicum purvianum* بأكثر من ٦٤ عزلة مختلفة من فيروس موزايك الدخان، وقد كانت هذه العزلات مأخوذة من هذه أو تلك من سلالات فيروس موزايك الدخان، على أساس أعراضها على الدخان و الطماطم؛ إذ اختلفت هذه العزلات فيما بينها من حيث إصابتها لسلالات

النبات المذكورة، والتى كانت حساسة لها جميعا؛ فقد كانت كل سلالة نباتية حساسة لواحدة على الأقل من هذه العزلات.

ولهذا فإنه فى حالة زراعة الصنف الذى يعتبر مقاومًا لفيروس ما، فإنه يجب أن يراعى عند زراعته استخدام الوسائل التى تمنع اجتماع النباتات والفيروس، أو تقليل ذلك إلى أدنى حد ممكن، فلقد ذكر Dawson سنة ١٩٦٧ أنه عند زراعة أصناف الطماطم المقاومة لفيروس موزايك الدخان.. فإن الفيروس يظل لعدة أسابيع قادرا على الانتشار خلال النبات جهازيا، ووجد فيها بتركيزات ضئيلة جدًا، ومع ذلك فلقد وجد أن العصير المستخلص من هذه النباتات المقاومة يعتبر أشد قدرة على عدوى النباتات المقاومة السليمة أكثر من العصير المستخلص من النباتات الحساسة، كما أظهرت النباتات المقاومة أعراضًا عند إصابتها بواسطة هذا العصير.

استخدام السلالات الضعيفة من الفيروس:

فى بعض الأحيان تؤدى إصابة النباتات بالسلالات الضعيفة من فيروس ما إلى منع إصابة هذه النباتات بأشد سلالات هذا الفيروس، ولذا فقد اقترح بعض الباحثين عدوى النباتات بالسلالات الضعيفة كإحدى وسائل مقاومة الإصابة بالسلالات الفيروسية الشديدة، والتى تحدث خسائر كبيرة، إلا أن **هذه الوسيلة لا يمكن استخدامها إلا فى حالات الإصابة الشديدة، ولا يمكن النصح باستخدام هذه الطريقة فى الظروف التطبيقية لعدة أسباب، منها:**

١ – هذه السلالات التى تعتبر ضعيفة تؤدى هى الأخرى إلى خفض فى المحصول، يتراوح بين ٥ - ١٠٪.

٢ – العدوى الصناعية للنباتات تجعل منها مصدرًا، تنتقل منه العدوى إلى المحاصيل المجاورة التى قد تكون حساسة لهذه السلالات، وتحدث بها خسائر كبيرة، خصوصًا إذا كان الفيروس ذا مدى عوائلى واسع.

٣ – من الممكن أن تتغير السلالة فى بعض النباتات، وتتحول إلى سلالة شديدة.

٤ – قد تزيد العدوى بالسلالات الضعيفة من حساسية النباتات للإصابة بفيرسات أخرى شديدة، وفى هذه الحالة تؤدى الإصابة المشتركة بأكثر من فيروس إلى خسائر جسيمة فى المحصول. ويعتقد Broadbent أنه حيث إن العدوى المتأخرة للطماطم فى الصوبة بفيروس موزايك الدخان تؤدى إلى خفض كبير فى نوعية الطماطم وقيمتها التجارية، إذا ما قورنت بالإصابة المبكرة، ولذا فإنه يرى أنه فى حالة المزارع التى يظهر بها ذلك باستمرار من الممكن عدوى النباتات بالسلالات الضعيفة، ومع ذلك فالعثور على ما يسمى بالسلالات الضعيفة من فيروس موزايك الدخان يعتبر عملية غاية فى الصعوبة.

استخدام المواد المضادة للفيروسات Antiviral Preparations :

لقد بذلت جهود كبيرة للعثور على تلك المواد المثبطة التى إما أنها تمنع الإصابة أو تعوق تزايد الفيروس عدديا إذا ما حدثت الإصابة؛ أى تلك المواد التى تؤثر على الفيروس تأثيراً مباشراً مثلما تفعل المبيدات الفطرية فى حالة الفطريات الممرضة للنباتات، وقد سبق أن ذكرنا أنواع المركبات وناقشنا تأثيرها، **وتنحصر العقبات الأساسية فى البحث عن هذه المثبطات فيما يلى:**

١ – إن المادة المثبطة لابد إما أنها تمنع حدوث الإصابة، أو تمنع تضاعف الفيروس عدديا مع عدم إحداث أى ضرر للنبات نفسه، ويعتبر ذلك أهم عقبة، لأن تزايد الفيروس عدديا يرتبط ارتباطًا وثيقًا بالعمليات الحيوية، التى تتم فى الخلية النباتية؛ مما يجعل من الممكن جداً أن أى مادة تمنع تكاثر الفيروس تؤدى بالتالى إلى الإضرار بالنبات. والحالة الوحيدة التى تخص الفيروس هى عملية تزايد الـ RNA ، ولذلك فإذا وجدت تلك المثبطات التى تعوق هذه العملية وحدها دون أن تؤثر على العمليات الأخرى داخل الخلية، فمن الممكن أن تكون ذات فائدة فى مقاومة الإصابة الفيروسة، ومن المعروف أن 2-Thiouracil له القدرة على منع تمثيل حمض RNA الفيروسى، إلا أن له مع الأسف أضراراً أخرى جانبية.

٢ – ولمنع الإصابة التى تتم بواسطة الحشرات.. فإن المواد المضادة للفيروس، لكى تكون فعالة لابد أن يكون سارياً فى أوعية النبات، وقد سبق أن ذكرنا أن المواد التى تعامل بها

الأوراق فقط تؤثر تأثيرا جزئيا ضد الفيروس أو الفيروسات التى تنتقل ميكانيكيا مثل فيروس موزايك الدخان.

٣ - المادة أو التحضير السارى فى العصارة لابد أن يظل فعالا لفترة طويلة نسبيا؛ لأن الاستخدام المتكرر لمثل هذه المواد يجعلها غير اقتصادية، كما أن الكثير من المواد التى يعرف لها تأثير مضاد للفيروس، تفقد هذه الخاصية داخل النبات.

٤ - كما لابد أن يكون من الممكن إنتاج مثل هذه المواد على نطاق تجارى واسع وأن يكون رخيص الثمن، ويتوقف ذلك بالطبع على المحصول وعلى الفيروس، وإلا فإنه لن يمكن استخدامه حتى فى حالة المحاصيل ذات القيمة العالية، والتى تزرع فى الصوب.

٥ - وحتى يمكن استخدام المستحضرات المانعة للفيروس على محاصيل كثيرة، فلابد أن يكون مستوفيا لمتطلبات الأمان الصحى بالنسبة للمحاصيل، التى تستخدم فى غذاء الإنسان والحيوان، ولقد ظهر أن كثيراً من المواد التى أظهرت تأثيراً ضد الفيروس غير مجدية لأن لها تأثيرات ضارة على صحة الإنسان والحيوان.

وفى الوقت الحالى يرى الباحثون أن محاولة مقاومة الفيروس بواسطة المبيدات الحشرية الجهازية لمقاومة الناقلات أفضل بكثير من المواد، التى تؤثر على الفيروس تأثيراً مباشراً داخل النبات.

انتشار الفيروسات ومقاومتها فى الصوب «البيوت المحمية»:

تنتقل الفيروسات بطرق مختلفة - وتحدد طريقة الانتقال الانتشار الطبيعى للفيروس ومعرفة كيف يوجد المرض تجريبيا. وفى الطبيعة تنتشر الفيروسات بالتلامس أو بالنقل بالعصير الذى يعرف بالنقل الميكانيكى، وكذلك بواسطة البذور وبالنواقل مثل المن والتربس والنطاطات وبواسطة الفطر والنيماتودا والحامول. وتعتبر النواقل خاصة المن مهمة جداً بالنسبة لانتشار الفيروسات فى الطبيعة.

إن التلوث بالفيروسات يوجد فى الصوبة كما يوجد فى الحقل. وحتى فى الصوبة التى تختبر دائما بواسطة الاخصائيين فإن التلوث يظهر من حين لآخر. ربما نتيجة لدخول بعض

الحشرات الملوثة مثل المن أو بعدم توفر الوسائل الصحية إذاما كانت من الفيروسات التى تنتقل ميكانيكيا.. **ولتجنب التلوث فى الصوبة توجد بعض القواعد التى لابد من اتباعها، وهى:**

١ ـ لابد وأن تكون الصوبة خالية من الحشرات.

٢ ـ فحص النباتات باستمرار لخلوها من الحشرات خاصة المن. وإذا ما وجد أى نبات مصاب بالحشرات يمكن غمره فى محلول نيكوتين ٠,١٢٪، وللوقاية ترش النباتات بمبيد جهازى أو التدخين باستمرار، وحيث إن المن ربما يصبح مقاومًا للمركبات العضوية الفسفورية، فإنه يمكن اللجوء إلى المبيدات الحشرية الجهازية أو تجنب الرش الزائد.

وحيث إن الرش بالمبيدات الجهازية يأخذ وقتًا أقل، فيمكن النصح بالرش بمحلول نيكوتين.

٣ ـ بعض الفيروسات مثل TMV و PVX معدية لدرجة أن الأيدى والأدوات إذا ما لمست النباتات المصابة ثم السليمة تحدث العدوى. وحيث إن هذه الفيروسات فى العصير فيمكن أن تستمر الفيروسات الملتصقة بالأدوات وأدوات الزراعة لمدة طويلة قادرة على الإصابة؛ لذا يوصى بغسل الأيدى بالماء والصابون إذا كان من الضرورى لمس النباتا المصابة. غسل الأدوات والأوانى المستعملة فى استخلاص الفيروس باستمرار بواسطة الصابون أو محلول ثلاثى فوسفات الصوديوم. ووجد أن غمس الأدوات لمدة ٣٠ ثانية فى محلول مشبع من كلوريد الكالسيوم أو ٣٪ ثلاثى فوسفات الصوديوم أو مخلوط من ١٦٪ صابون أو معلق من bintonite يمنع انتقال بعض الفيروسات مثل فيروس X البطاطس. والأقل تأثيرًا هو كلوريد الزئبق ١ : ١٠٠٠ أو محلول مشبع من كربونات الصوديوم.

والأحسن قليلاً هو كلوريد الكالسيوم عن ثلاثى فوسفات الصوديوم كمطهر للأدوات الملوثة بواسطة فيروس موزايك الدخان، وكذلك الغمر فى ٧٠٪ كحول إيثانول مطلق، ثم اللهب ثم الغسيل فى ماء جارٍ سريع مفيد أيضًا.

٤ – يراعى حمل النباتات بأيدى نظيفة غير ملوثة بالفيروس، وكذلك الأدوات ومنع التدخين فى الصوبة، حيث إن موزايك الدخان ربما ينتقل خلال أعقاب السجاير.

٥ – تجنب التلامس بين النباتات بواسطة ترك مسافة كافية بينهما أو فصلها عن بعضها بواسطة شبك بلاستيك أو أحسن بشبك سلك. لا يفضل أن تلمس الأيدى أو خراطيم المياه النبات.

٦ – إذا استعملت التربة أكثر من مرة أو حتى كانت جديدة فربما تحتوى على مواد ملوثة. مثل جزيئات البطاطس الصغيرة أو ناقلات الفيروس. ربما تحتوى التربة الجديدة فيروسات التربة ونواقلها. الأصص الفخارية لابد من تعرضها للبخار، والأصص البلاستيك لابد من غسلها بالماء والصابون، أو بمخلوط من ثلاثى فوسفات الصوديوم والصابون وتشطف بالماء.

٧ – يجب على العمال والعاملات ارتداء صديريات « أوفرول » نظيفة ومعقمة تستبدل يوميا.

٨ – تقليص الزيارات إلى البيوت المحمية « الصوب » قدر الإمكان.

٩ – إلزام الزوار للبيوت المحمية « الصوب » ارتداء صديريات معقمة، وغسل أيديهم قبل الوصول إلى البيوت.

١٠ – ضرورة توعية العاملين فى البيوت المحمية والحقول بأن فيروس مثل موزايك الدخان قد ينتشر عن طريق أحذيتهم وملابسهم وأيديهم؛ لذا من الضرورى تعقيمها وتنظيفها بصورة مستمرة.

١١ – ضرورة امتناع العاملين فى البيوت المحمية عن التدخين أثناء العمل، ويجب غسل أيديهم قبل ملامسة النباتات حيث قد تكون السجائر مصدراً للفيروس . كما يجب ملاحظة عدم وضع الأدوات التى يستعملونها مثل مقص التقليم والسكين وخيوط ربط النباتات فى جيوبهم، التى قد تحتوى على التبغ المنثور من السجائر.

١٢ – يوصى باستعمال وإنتاج أصناف مقاومة أو متحملة ضد الفيروسات.

الباب الحادى عشر

إنتاج نباتات خالية من الفيروس باستخدام زراعة الأنسجة

Production Of Virus Free Plants Using Tissue Culture

إنتاج نباتات خالية من الفيروس
بأستخدام زراعة الأنسجة
Production Of Virus Free Plants Using Tissue Culture

إن التزايد العددى للفيروس عادة ما يكون مصاحبا لعمليات تمثيلية عادية فى النبات، دون أن يتدخل فى هذه العمليات. ومن المعروف أن هناك بعض المثبطات الفيروسية التى يكون تأثيرها ساما أيضا على بعض النباتات، وبالإضافة إلى ذلك فإنه لا يمكنها القضاء على الفيروس فى كل خلايا النبات؛ حيث يعود الفيروس الى التضاعف مرة أخرى، بعد انتهاء المعاملة، ويعود بذلك الى تركيزه الأصلى.

كما أن قتل الناقلات الحشرية والنيماتودية قد لايمنع أنتشار الفيروسات النباتية، كما أن بعض الفيروسات تنتشر ميكانيكيا والبعض الآخر يكون محمولا على الإبر الفكية للحشرات؛ مما يعنى أنها تنتقل مباشرة بعد أن تدفع الحشرة بخرطومها إلى أنسجة النبات، ومثل هذه الفيروسات لا يمكن مقاومتها بأستعمال المبيدات الحشرية.

ومن حسن الحظ أن أغلب الفيروسات المعروفة لا تنتقل عن طريق البذور أى إن بذور النباتات المصابة تنتج فى أغلب الأحوال نباتات سليمة، ومع ذلك فإن مثل هذه النباتات لا يعتمد عليها كلية، لانها إذا ما أصيبت، فإن العدوى تنتقل من جيل إلى جيل عن طريق التكاثر الخضرى؛ مما يجعل المحصول بعد عدة سنوات مصابًا بنسبة كبيرة قد تقرب من ١٠٠٪، خصوصا إذا ما كانت الفيروسات متخفية أى لا تظهر لها أعراض مرئية.

وفى بعض الحالات يمكن العثور على نبات أو أكثر خالٍ من الفيروس، وإذا كان المحصول مصابا بفيروسات مختفية فإنه يجب اللجوء إلى عمليات الاختبار الروتينية مثل التشخيص السيرولوجى والبيولوجى باستعمال نباتات الاختبار، وكذا الميكروسكوب الإلكترونى أما

بالنسبة لتلك المحاصيل التى تكون مصابة تماما بالفيروسات، فإن هناك طرقًا يمكن استخدامها لتخليص مثل هذه المحاصيل من الإصابة بفيروسات معروفة، ومن هذه الطرق المعاملة الحرارية أو زراعة الأنسجة الميرستيمية أو كليهما معا.

زراعة المرستيميات القمية Meristem - Tip Culture

لقد لاحظ Kotte & Robbins, 1922 نمو قمة الجذور على محاليل معدنية مزودة بالسكريات والأسبارجن والببتون. واستطاع White, 1943 زراعة جذور طماطم مصابة بفيروس TMV فى المعمل. وبتقطيع هذه الجذور واختبار المناطق المختلفة بالحقن على عائل يعطى أعراضًا موضعية للفيروس. تأكد أن تركيز الفيروس فى المناطق الأمامية أقل بالمقارنة بالأجزاء القاعدية، أما قمة الجذر فلم يوجد دليل على احتوائها على الفيروس. أيضا لاحظ Limasset & Cornuet , 1949 أن النباتات المصابة جهازيًا ينخفض تركيز الفيروس بالقرب من نقطة النمو (apical meristem). وفى نقطة النمو نفسها لم يوجد الفيروس فى نصف الحالات . وهذا أدى إلى أن Morel & Martin, 1952 افترضا أنه يمكن عزل المرستيم الطرفى (apical meristim) فى النباتات المصابة جهازيا فى المعمل، وذلك للحصول على نباتات، خالية من الفيرس. ويتوقف نجاح العلاج على الفيروس المرغوب استئصاله، وكذا على خصائص النبات.

فمن المعروف أن العلاج الحرارى يكون مفيداً فى حالة الفيروسات الخيطية، وكذلك بالنسبة للأمراض المتسببة عن ميكوبلازما.. وهناك أربع مراحل للعملية العلاجية:

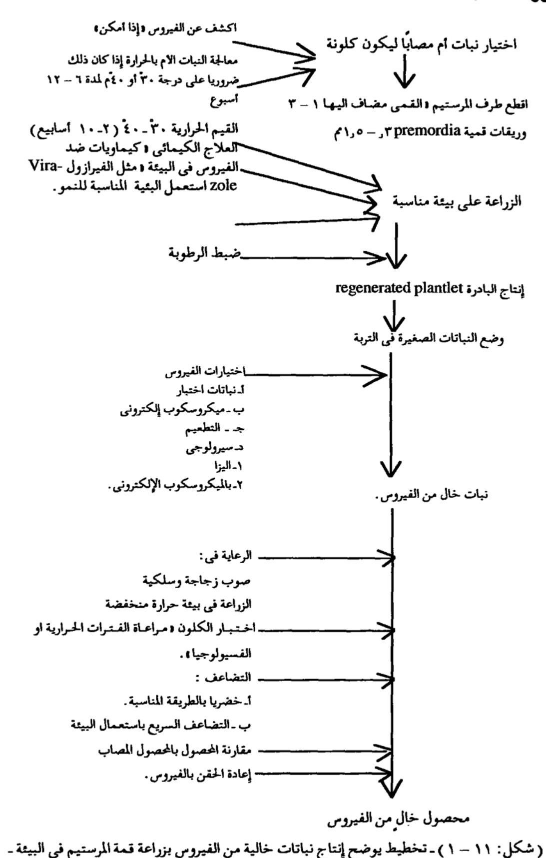
١ ـ تعريف الفيروس وتشخيصه.

٢ ـ العلاج.

٣ ـ اختبار النباتات المعاملة.

٤ ـ الإكثار مع استمرار الفحص مع العمل على عدم حدوث الإصابة ثانية، وسبق أن تحدثنا عن العلاج الحرارى.

وعند استعمال اصطلاح Virus free فإنه سوف يقصد بذلك أن النبات خالٍ من الفيروسات التى تم اختباره بالنسبة لها، ومع ذلك فقد يحتوى النبات على فيروسات أخرى غير معروفة أو لم يتم اختباره بالنسبة لها. وفى الحقيقة أن كثيراً ما تكتشف الفيروسات غير المعروفة فى نباتات، تم تخليصها من الفيروسات المعروفة، ولذلك فإنه يفضل القول بأن النبات virus tested عن استعمال اصطلاح Virus free، ويجب ان يكون معروفًا أن مثل النباتات لا تكون منيعة، ولكنها قد تصاب مرة أخرى.



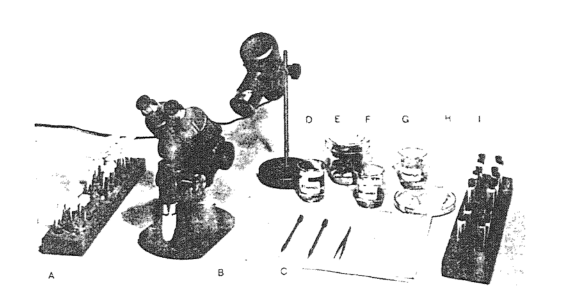
(شكل: ١١ – ١) - تخطيط يوضح إنتاج نباتات خالية من الفيروس بزراعة قمة المرستيم فى البيئة.

وقد نجح العلماء فى تدعيم هذه الطريقة عندما أخلوا نبات الداليا من الفيروسات حيث وضعت بعض المرستيمات المفصولة على بيئات مغذية مختلفة، فأعطت نباتات بطول ١ـ٢ سم دون جذور، وبتطعيمها على بادرات صغيرة خالية من الفيروس حصلا على نباتات سليمة. ومنذ ذلك العمل استعمل هذا التكنيك بواسطة علماء كثيرين لشفاء الأصناف المهمة المصابة فى عدد كبير من المحاصيل.

يحاط المرستيم بخلايا نشطة الانقسام أبعادها (٠,١ سم) قطراً، و (٠,٢٥ م) طولاً. وكقاعدة يقطع المرستيم فى كل من الفرع الرئيسى أو البراعم الإبطية، وتأخذ الاسم نفسه. تكون فرصة النمو غالباً أقل عندما تقطع من المرستيم واحد أو اثنين من منشأ الورقة (Leaf primordia)، أما القمم التى تكون حوالى (١م) تأخذ فرصة أحسن فى النمو، ولكنها تكون أقل فى فرصة إخلائها من الفيروس.

التكنيك والبيئة Technique and Medium :

المرستيمات سواء طرفية أو جانبية تكون محمية بواسطة الأوراق النامية أو طبقات « حراشيف » تمتد لتحميها. للتعقيم السطحى للفروع تغمر عدة ثوانٍ فى كحول ٩٦٪، ثم تغمر فى محلول من ٥٠ جم / لتر هيبوكلوريد الكالسيوم التجارى لمدة ١٠ ـ ٢٠ دقيقة، ثم تغسل عدة مرات فى ماء معقم. إذا لم تتوفر غرفة معقمة يجرى تقطيع المرستيمات فى معمل خالٍ من الأتربة، ومن المرغوب جدا رش المكان بالكحول قبل الاستعمال. ويحتاج بينوكلار تكبير (٢٠ ـ ٤٠x)، ويعقم بعد كل عزل بواسطة قماش مبلل بالكحول. بجانب البينوكلار يوضع ٦ ـ ١٠ قطع ورق ترشيح معقم، و٢ بيكر سعة ١٠٠ مل يملأ أحدها بالكحول والآخر بالماء المعقم (شكل ١١ – ٢). لمنع أى تلوث ميكروبى أو فيروسى، يكون من المهم وضع الإبر وأدوات التقطيع فى الكحول. يمسك الفرع باليد تحت البينوكلار ثم تفصل الأوراق غير الناضجة ومنشئ الورقة Leaf primordia بواسطة الضغط الخفيف بالإبرة بواسطة اليد الأخرى، ثم تفصل قمة المرستيم فى بعض الأنواع مثل الكرايزانثم، يكون المرستيم مفلطحًا واحتواؤه على Primordia عند القطع غير متاح.



شكل (١١ – ٢): الأجهزة والأدوات التى تستعمل فى قطع المرستيم لزراعتها على بيئة فى الأنابيب «أ» ميكروسكوب «x ١٠ ـ ٤٠»، ولمبة «ب» ورق ترشيح معقم، وعليه إبرة وسلاح مشرط وملقط «C»، إيثانول «D»، براعم معقمة «E» ، ماء معقم «F»، برافين ، معقم في إيثانول «G» قطعة قطن معقم في الإيثانول «H» أنابيب معقمة ومغطاة ببرافين معقم «I».

بعد ذلك توضع العينة فى بيئة مغذية فى أنبوبة الزراعة بواسطة قضيب النصل ببطء واحتراس. وفى البيئة السائلة ترتكز المرستيمات على قنطرة من ورق الترشيح المغمور جزئيا فى السائل.

تستعمل أشكال وأحجام من أنابيب الزراعة، خصوصًا الأنابيب الضيقة (قطر ١٠ مم) ويستعمل زجاج بيركس، وتغطى الأنابيب بأغطية بلاستيك أو ألمونيوم.

كما يمكن استخدام سدادات من القطن، على أن تعقمها باللهب، ثم تغطى بالبرافين ويجب أن يكون إغلاق الأنابيب محكمًا، وهذه الطريقة فى غلق الأنابيب تمنع تلوثها لاثنى عشر شهرا.

ويجب مراعاة ألا تحرق سدادات القطن عند تعقيمها باللهب، لأنها تكون ذات تأثير سام

على القمة النامية.

فى البداية وضعت البيئة المغذية بواسطة بيئة هوايت White, 1934، والتى يضاف إليها عناصر محدودة، وبعد ذلك أضيفت تحسينات عديدة للبيئات. وهناك بيئة جديدة وضعت بواسطة موراشينجى وسلوج Murashinge & Sloog, 1962 (جدول ١١ - ١)، وهى تتميز بتركيز عالٍ من أيونات البوتاسيوم والأمونيوم والـ myo - inositol، ووجدا أن زيادة التركيزات مهمة فى حالة زراعه قمة المرستيم فى البطاطس، والتى تعطى نباتات أكثر اخضرارا وأقوى نمواً عن التى أضيفت إليها تركيزات قليلة من العناصر الكبرى. ويضاف الحديد فى أشكال مختلفة، ويبدو أن iron - Chelate كان أحسنها. وكمصدر للكربون يضاف الجلوكوز ، الفركتوز أو السكروز والأخير أكثر استعمالا. وبجانب خليط من الفيتامينات، درس تأثير أنواع من مشجعات النمو. رغم أنه من المعروف أن الأوكسين Napthalene Acetic acid (NAA) والاوكسين 3- indole acetic acid ، IAA، تنبه تكوين الجذور، ولكن استمرار استعمالها قد يثبط نمو الجذور. وعملية نقل المرستيم القمى إلى بيئة جديدة خالية من مواد النمو تكون ضرورية. وعلى العكس 1966 حفظ Nishizawa & Nishi, نبات الزنبق Lily لمدة ٢٤ ساعة.

جدول ١١ - ١: تركيب البيئات التى استخدمها مولر

(١٩٦٤) فى زراعة القمم المرستيمية

1 - Major salts	**١ - أملاح رئيسية**	mg l
$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	كربونات كالسيوم	500
KNO_3	نترات بوتاسيوم	125
$MgSO_4 . 7H_2O$	كبريتات مغنسيوم	125
KH_2PO_4	فوسفات بوتاسيوم	125
KCI	كلوريد البوتاسيوم	1000
$(NH_4)_2 SO_4$	كلوريد الامونيوم	1000
Minor elemnts	عناصر صغرى:	
$FeCl_3 . 6H_2O$	كلوريد الحديديك	1
$ZnSO_4 . 4H_2O$	كبريتات الزنك	1
$H_3 BO_3$	حمض البوريك	1
$MnSO_4 . 4H_2O$	كبريتات المنجنيز	0.1
$CuSO_4 . 5H_2O$	كبريتات النحاس	0.03
$AICI_3$	كلوريد الألومنيوم	0.03
$NiCl_2 . 6H_2O$	كلوريد النيكل	0.03
KI	يوريد البوتاسيوم	0.01
Organic constituents	مكونات عضوية (١)	
Gibbrllic acid	حمض الجبريليك	0.1 mgl
Sucrose	سكر	20 g.l
Difco agar	آجار	6 g.l
2 - Organic contstituents II (alternative)	**٢ - مكونات عضوية**	
Mg	مغنسيوم	100
Difo agar	آجاد	1
Myo - inositol	انيوسيتول	1
Ca- pantothenate	بانسوثينات الكالسيوم	1
Nicotinic acid	حمض النيلوتين	1
Pyridoxine HCI	بيريدوكسين	1
Thiamine HCL	ثيامين	0.1
X- Napthalene acetic acid	نفثالين حمض الخليك	0.01
Gibberellic acid	حمض الجبريليك	20 gl
Biotin Sucrose	بيوتين - سكر	6 gl

وقد استخدم محلول 20/g/I من NAA & قبل قطع المرسيتم القمى، وهكذا استفاد بتأثير الأوكسين دون التعرض لسميته.

أما تأثير حمض الجبريليك Gibberellic acid فقد وجد أن له تأثيراً خاصاً؛ حيث يمنع الانقسام غير المنتظم unorganized الذى يؤدى لتكوين الكالوس، ويشجع المرستيم على النمو السريع . وعلى العكس مثل حالة القرنفل تحت هذه الظروف تفشل الجذور فى النمو - أيضا إذا تواجد NAA ✂ يكون من الضرورى النقل الى بيئة مشابهة خالية من حمض الجبريليك وأما السيتوكنين « Cytokinin » قد يحتاج إليه لتشجيع المرستيم الساكن على النمو، وقد يضاف أيضا المواد heat Iabile بعد تعقيمها بالترشيح الدقيق.

بمجرد نمو المرستيم وإخراج جذور تنقل إلى أصص صغيرة، تحتوى خليطًا من السماد البلدى وللحفاظ على رطوبة النباتات تغطى بأوعية زجاجية. وإذا لم تتمكن من إنتاج جذور تطعم على بادرات سليمة (Wuth & Dode, 1970).

وقد تمكن Buys, 1969 من فصل نباتات القرنفل دون جذور ونقلها للتربة، ويعتقد أن الجذور النامية والخارجية من المرستيم القمى فى أنبوبة المزرعة يكون استعمالها قليلاً فى التربة.

وعندما يصل النبات للحجم المناسب يختبر لوجود الفيروس بالسيرولوجى أو الميكروسكوب الإلكترونى أو بالحقن على العوائل المشخصة. وحتى يأخذ التركيز القليل جدا من الفيروس المحتمل تواجده فى النبت الناتج الفرصة للظهور وزيادة التركيز، تصبح عملية إعادة الاختبار ضرورية.

العوامل التى تتحكم فى استئصال الفيروس:

Factors controlling Virus eradication

١- حجم المرستيم القمى: Meristem - tip size

عند استخدام تكنيك زراعة المرستيم القمى لإنتاج نباتات خالية من الفيروس لأول مرة، اعتقد الكثير من المشتغلين أن النباتات المنتجة تكون سليمة؛ لأن الفيروس لم يغزو الخلايا

المرستيمية فى البرعم. وفيما بعد وجد فى حالات عديدة أن هذا الاعتقاد غير صحيح، والرأى الحالى يقول بأن الفيروسات قد تغزو الخلايا المرستيمية بدرجات مختلفة تعتمد على نوع الفيروس ونوع العائل (Mori, 1977). فمثلا فيروس PVX &TMV قد سجل غزوهما للمرستيم القمى بدرجة كبيرة عن فيروس PVY & CMV.

إن نجاح إنتاج نباتات خالية من الفيروس بواسطة زراعة المرستيم القمى يعتمد على الحجم الأولى للقمة المستعملة فى الزراعة. وكما ذكر بواسطة Stone, 1968 فى القرنفل المصاب بفيروسات Iatet, Vein mottle, carnation mottle. يختلف حجم القمة من (١ر٠ - ٢مم) فى القطر، وهذه القمة تتكون غالبًا من قبة مرستيمية (meristematic dome) واثنين أو أكثر من Leaf primordia. عمومًا يتناسب عدد النباتات الخالية من الفيروس الناتجة تناسباً عكسيًا مع حجم القمة. هكذا فى بعض الحالات من الممكن قطع مرستيم قمى خالٍ من الفيروس من عضو نباتى مصاب، وإعادة إنباته ليعطى نباتاً سليماً. ولكن فى حالات أخرى تستأصل الفيروسات من المرستيم القمى أثناء زراعة النسيج.

فى نباتات عديدة يكون من المستحيل قطع القمة بحجم صغير لتجنب الفيروس أو القضاء عليه in Vivo فيما بعد. وفى هذه الحالات يجب أخذ قمة كبيرة للزراعة، وهذه بالتالى تحتوى تركيزاً عاليًا من الفيروس، ورغم ذلك يظل الاحتمال قائمًا فى الحصول على نباتات خالية من الفيروس من هذه الأنسجة المصابة بواسطة المعاملة الحرارية أو بالكيماويات.

لوحظ أيضًا أن إخراج الجذور قد يتأثر بحجم النسيج المزروع. فقد وجد Stone, 1963 أن قمة القرنفل الأصفر من (٢ر٠ مم) لا تعطى جذوراً، وبينما الأكبر من (٧٥٠ر مم) تنتج نباتات محتوية على mottle virus. القمة التى يتراوح طولها بين (٢ر٠ - ٥ر٠مم) لها فرصة أحسن فى إنتاج نباتات خالية من الفيروس. وفى حالة Cassava القمم أكبر من (٢ر٠مم) فقط تعطى نباتات كاملة، بينما تعطى القمم الأقل من (٢ر٠مم) تعطى إما كالوس أو كالوس مع جذوره. فى كل أصناف Cassava الهندى والنيجيرى، لا يعتبر وجود leaf primodia أساسيًا لإنتاج نباتات. ولكن فى rhubarb من المهم قطع القمم ذات ٢-٣ primordial Leaves والقمم الأصغر لا تنمو.

٢ - درجة pH البيئة:

درجة حموضة البيئة لها تأثير محدود على النمو، وعمومًا تكون بين ٥,٥ - ٥,٨، ويجب الأخذ فى الاعتبار انخفاض pH أثناء التعقيم بالأوتوكلاف. ذكر Stone, 1963 أن المرستيمات القمية للقرنفل تنمو أحسن على pH5.5 (حوالى ٥٩٪) عن pH 6 (حوالى ٤٪) لاحظ Mellor & Stace Smith أن درجة pH فى البيئة تنخفض خلال أسبوع من ٥,٧ الى ٥,٤. يثبط إخراج الجذور عند انخفاض pH البيئة.

٣ - الضوء والحرارة والموسم:

أنابيب الزراعة المحتوية على المرستيمات القمية توضع تحت ضوء فلورسنت، ولأغلب النباتات ١٦ ساعة ضوء يومياً وحرارة حول ٢٢°م تكون كافية. المرستيمات القمية فى البطاطس تنمو أحسن على ٢٥° م، بينما الأبصال قد تحتاج لحرارة ١٢ - ١٥°م. وبخصوص النسبة البلارجونيوم، ذكر Pillai & Wildebrant, 68 أن فترة الإظلام ضرورية ربما لتقليل التأثير المثبط للمواد الفينولية.

أوضح عديد من الباحثين فترة تأثير الموسم على عملية زراعة المرستيم. ذكر Stone, 1963 أن بقاء مرستيم القرنفل يكون أحسن فى بداية الربيع وبداية الخريف عن الشتاء والصيف. بينما ذكر Vanos, 1964 أن المرستيم القمى فى القرنفل المعزول فى الشتاء يخرج جذوراً بسهولة اكثر، ولكن المرستيمات المعزولة فى الصيف تعطى نسبة عالية من النباتات الخالية من الفيروس.

وجد Moller & Stace - Smith 1969 أن أصناف البطاطس التى تفصل قمتها فى الربيع وأول الصيف تعطى جذوراً أكثر عن التى تؤخذ متأخراً عن ذلك. فى الأبصال والكورمات، أحسن النتائج حصل عليها عندما تفصل فى نهاية فترة الكمون.

٤ - المعاملة الكيماوية : Chemotheropy

اقترح « Quak, 1961 » أن وجود الكيماويات المشجعة للنمو فى بيئة الزراعة يسبب استئصال الفيروس أثناء زراعة الأنسجة. ولكن لا توجد تجارب تدعم هذا الرأى. اوضحت

التجارب التالية والتى فيها زرعت الأنسجة المرستيمية المصابة بفيروس CMV على بيئات تحتوى تركيزات مختلفة من Cytokinin & auxin، أن هذه المركبات فى بعض الأحيان تخفض تركيزات الفيروس ولكنها لا تستأصله. واقترحت الدراسات الأخيرة أن إضافة كيماويات (anti - metabolite) مثل Virazol (Ribavirin) فى بيئة الزراعة تكون أكثر كفاءة. هذه الكيماويات فى العادة مع المعاملة الحرارية تمنع تضاعف الفيروس فى الأنسجة المصابة؛ حيث يقف تخليق الفيروس، ويستمر تدهور الفيروس حتى يحدث الاستئصال. ذكر Shipard, 1977 أن Virazole استأصل PVX فى أنسجة الدخان المزروعة، وحديثًا وجد أن الفيرازول بتركيز (50 - 100 mg/1) استأصل فيروس موزايك الخيار من أنسجة *N. rustica*.

٥ - المعاملة الحرارية : Thermotherapy

فى سنة ١٨٨٩ ذكر فى جاوا أن قصب السكر الذى يعانى من مرض Sereh المتسبب عن فيرس ينمو أحسن بعد حفظه على ٥٠-٥٢ْم فى الماء لمدة ٣٠ دقيقة (Kobus, 1890). وكانت تستعمل أيضًا ضد فرض تقزيم الخلفة والخلل البكتيرى فى مناطق كثيرة من العالم؛ حيث كانت عدة آلاف من الآطنان من قطع قَطب السكر، تعامل كل سَنة فى حمام مائى كبير قبل زراعتها.

وفى سنة ١٩٣٦ وجد Kunkel أن أشجار الخوخ يمكن معالجتها من الاصفرار بعد المعاملة بالماء الساخن للأشجار الساكنة على ٥٠ْم لمدة ١٠ دقائق. وقد اكتشف أيضًا أن النتيجة تكون أفضل إذا نميت الأشجار لمدة ٣-٤ أسابيع فى الهواء الساخن ٣٥-٣٨ْم. وفى الحقيقة المعاملة بالماء الساخن عمومًا، تكون أقل ضررًا للنباتات او الأجزاء الساكنة من النبات عن الهواء الساخن.

وكان Kassanis, 1950 أول من ذكر أن قدرة الفيروس على الإصابة والتضاعف فى النباتات على ٣٦ْم لا ترتبط بدرجة الحرارة المثبطة له. فمثلاً فيروس Tomato bushy stunt له درجة حرارة مثبطة هى ٨٠ْم ولكنه لا يستطيع إصابة النبات على ٣٦ْم، ويستأصل من

النبات تماماً بحفظه على هذه الدرجة. قد يعزى استئصال الفيروس هكذا بالتعريض الطويل للنباتات المصابة لدرجة حرارة حول ٣٧ْم إلى النظام التمثيلى، الذى يغير التوازن بين تخليق الفيروس وانهيار الفيروس فى النبات، أو إلى فشل الفيروس فى التضاعف على هذه الدرجة، وعموماً الفيروسات التى يمكن استئصالها بالحرارة هى الكروية. وهناك فيروسان غير كرويين معروفان، يمكن استئصالهما بالمعاملة الحرارية هما Plum pox virus & Apple chlorotic leaf spot.

ويلاحظ أنه ليست كل الفيروسات فى النبات لها حساسية متشابهة للمعاملة الحرارية، ولاستئصال فيروسات عديدة قد تكون عدة أسابيع مدة كافية، بينما فى فيروسات أخرى فى النبات نفسه، وتحت الظروف نفسها قد تأخذ فترة أطول كثيراً، وربما طويلة جدا عن التى يتحملها النبات كما فى التفاح والقرنفل. وأيضاً سلالات الفيروس الواحد قد تختلف فى تحملها للمعاملة الحرارية.

فى بعض الحالات يوضع النبات الكامل على حرارة بين ٣٥ ـ ٤٠ْم لفترة، تتراوح بين أيام قليلة إلى عدة أشهر. هذا يستعمل أساساً فى الفراولة لأنها لا تنتج أشطاء. وفى rasp - berries حيث تموت القصبات فى السنة الثانية بعد حمل الثمار، فلهذا لا يمكن استعمالها فى تطعيم القمم المعاملة.

تستأصل فيروسات كثيرة من قمة الفروع المأخوذة من النباتات النامية، وتحفظ على حرارة حوالى ٣٧ْم لفترات مختلفة. بعد المعاملة الكافية تزرع هذه القمم، أو تطعم على بادرات خالية من الفيروس. وهذه الطريقة تستعمل بنجاح لتنقية أصناف من محاصيل مستديمة من عدد من الفيروسات؛ خصوصاً النباتات التى يسهل زراعة قمتها أو تطعيم قمتها.

على العموم يمكن القول أن المعاملة الحرارية لا تثبط الفيروس، ولكن تمنعه من غزو الفروع النامية أثناء المعاملة. ذكر Welsh & Nyland , 95 أن عدة براعم إبطية ساكنة فى عدد من الأصناف فقدت الفيروس الذى بها، ولذلك لا يستبعد حدوث تثبيط للفيروس.

زراعة المرستيم بعد المعاملة الحرارية : Meristem culture after heat treatment

رغم أن البيئة تكون مناسبة لنمو المرستيمات.. فإن قليلا منها ينمو والقليل منها يكون

خاليا من الفيروس. ولهذا فإن علماء كثيرين أجروا معاملة حرارية للمادة النباتية، ثم زراعة كمية من المرستيمات القمية منها.

ويفترض أنه خلال المعاملة الحرارية يثبط تضاعف الفيروس؛ حيث إن المعاملة الحرارية قد تعوق التمثيل الغذائى وتخفض النمو فى المرستيمات، فإنه يلزم تجارب لمعرفة إلى أى مدى يمكن حفظ المرستيمات على الحرارة العالية مع استمرار نموها، بالعمل على الكرايزانثم، صنف بلانش. وجد Hakkaart & Quak, 1964 أن المواد النباتية المعاملة بالحرارة لمدة ١٠، ٢٠، ٣٠ يومًا على الترتيب تنتج نسبة مئوية من النباتات الخالية من الفيروس تزيد من ٩ حتى ٩٠ تقريبا، فى حين أن المعاملة الحرارية لمدة ٤٠، ٥٠، ٦٠ يومًا لا تغير هذه النسبة المئوية، ولكنها تخفض بوضوح عدد المرستيمات النامية. يبدو أن التأثير يختلف حسب الصنف تحت الدراسة، فبالمقارنة وجد أن الصنف Migoli ينتج عددًا قليلاً من النباتات بعد ٢٠ ، ٣٠ يومًا من المعاملة الحرارية، والتى تكون خالية من فيروس بنسبة ١٠٠٪ ، ٧٠٪ على الترتيب، وكانت غير المعاملة ٩٪.

كان نمو القمم المفصولة بواسطة Vine, 1968 من نباتات الفراولة بعد وضعها أسبوع أو أكثر على ٣٥°م أسرع، ونسبة عالية منها وصلت للنضج عن الأخرى غير المعاملة، والتى كانت أيضا خالية من Crinkle and Vein chlorosis.

عادة تطبق المعاملة الحرارية على المادة النباتية الأصل قبل قطع المرستيم القمى. وضع Walke & Cooper, 1975 المرستيم القمى المصاب من *N. rustica*، والنامية فى بيئة ساكنة أو متحركة على ٣٢°م، وبواسطة هذه الطريقة استأصل CMV, alfalfa mosaic virus أو انخفض تركيزهما بشدة، بينما ظلت المزارع المتحركة نفسها على ٣٢°م، وربما زاد تركيزه بعض الشئ عنه على ٢°م .

يمكن القول أنه فى حالة الفيروسات الصعبة الاستئصال بواسطة زراعة المرستيم القمى، يؤخذ تطبيق المعاملة الحرارية قبل القطع فى الاعتبار . وهذه الطريقة المشتركة تكون مفضلة، عندما يكون النمو بطيئًا ونسبة النباتات الخالية من الفيروس صغيرة (مثل حالة

القرنفل). وفى هذه الحالات تكون المعاملة الحرارية المسبقة، وأيضًا قطع القمم بطول (١-٢مم) لها فرصة أحسن فى النمو والبقاء، معطية نباتات خالية من الفيروس.

تواجد الفيروس فى الأنسجة المرستيمية : Virus in meristematic tissue

زراعة المرستيمات القمية تهم الباحثين فى أمراض النبات؛ نظرا لأهميتها العملية والأقتصادية. فى الخمسينيات أدى التأثير المثبط للفيروس لعديد من هرمونات النمو إلى الاعتقاد أن التركيزات العالية من الهرمونات فى المرستيمات تثبط الفيروس، وهذه النظرية لم تثبت . ذكر بعض البحاث سنة ١٩٦٥ أن تركيز الفيروس ينخفض بواسطة النمو السريع للكالوس. وأظهرت اختبارات الحقن بمستخلص خلايا كالوس الدخان التعارض بين انقسام الخلية وتضاعف الفيروس. فى الانسجة النشطة الانقسام يغلب تخليق النيكلوبروتين الطبيعى وبعدها وأثناء استطالة الخلية يكون هناك تخليق للنيكلوبروتين الفيروسى.

ودعمت هذه النظرية بملاحظات Crowley & Mamson, 1960، حيث ربطا بين طول قمة الجذور الخالية من الفيروس فى نباتات الطماطم المصابة بالفيروس بالحد الذى يحدث عنده الانقسام الميتوزى. تسبب مثبطات النمو فى البيئة تقصيراً فى منطقة الانقسام الميتوزى فى قمة الجذر، وتتحدد المنطقة الخالية من الفيروس بالحدود نفسها. ذكر Hollings & Stone, 1964 أن المرستيم القمى المفصول من نباتات القرنفل المصابة بفيروس Carnation mottle تحتوى هذا الفيروس فى تركيزات، يمكن أن تعطى البقع الموضعية فى *C. amaranticolor*، فى حين أن بعد ٣٠ ساعة على بيئة مغذية تصبح المرستيمات غير معدية، ولذلك يقترح أن التفاعل مع البيئة المغذية يمنع تواجد الفيروس فى القمة. النتائج نفسها وجدت بواسطة Walkey et al, 1969 فى المرستيم القمى فى ***N.rustica*** المصاب بفيروسات Cherry leaf roll أو Arabis mosaic؛ حيث فصلوا المرستيمات دون leaf primordia، وطحنوا كل مرستيم فى نقطة من فوسفوتنجستات الصوديوم، التى توضح رؤية جزيئات الفيروس الكروية. وبالميكروسكوب الإلكترونى شوهدت جسيمات فيروسية، مع أن هذه القمم المزروعة تعطى نباتات سليمة. وقد ثبت أيضًا وجود الفيروسات العصوية S, X, M فى الميرستيمات القمية المفصولة من البطاطس، والتى تعطى غالبًا نباتات خالية

من هذه الفيروسات.

فى الوقت الحاضر لا يوجد تفسير علمى عن حقيقة أن بعض الفيروسات دون الأخرى يمكن استئصالها بزراعة المرستيمات القمية. الاختلاف فى إمكانية استئصال الفيروسات قد يكون بسبب الاختلاف فى التأثير التثبيطى للبيئة المغذية، بالإضافة إلى الاختلاف فى درجة توزيعها فى القمة

والاحتمال المقترح أن هناك تنافسًا بين تخليق الفيروس، وبين تخليق النيكلوبروتين اللازم لانقسام الخلية يبدو أنه غير صحيح. ولكن يمكن أن يعزى للتأثير المفيد للمعاملة الحرارية على استئصال الفيروسات من الأطراف، وتفسير هذه النظرية غير مفهوم تمامًا ولكن هذا لا يقلل من الأهمية العملية لزراعة المرستيمات القمية.

تأثير استئصال الفيروسات : Effect of limination of viruses

إن زراعة المرستيمات القمية استعمل بواسطة عديد من العلماء للحصول على أجزاء من النباتات التى تتكاثر خضريًا خالية من الفيروس. وهدف تطبيق هذا التكنيك مضاعف؛ فالنباتات الناتجة تمدنا بمادة نباتية، يمكن دراسة تأثير الفيروسات فيها، وأيضًا تشكل قاعدة للإنتاج التجارى. ويجب أن نضع فى اعتبارنا أن استئصال الفيروس لا يعطى مناعة، ويجب توقع إعادة الإصابة «الانتكاس». وأيضا سرعة الانتكاس وطبيعة درجات المقاومة يجب أن تقدر بواسطة دراسة الوبائية للفيروسات تحت الدراسة.

مع أن عديداً من الفيروسات معروفة فى القرنفل، إلا أن Hakkart, 1964 وصف الأعراض والخسائر الحادثة بفيروسات Ring spot vein mottle & Carnation mottle فى القرنفل صنف وليام. ومع أنه لا تظهر أعراض واضحة عند الحقن الصناعى بفيروس mottle فإن نمو النباتات المصابة ينخفض بوضوح. وفيروسات , Ring spot Vein mottle تعطى أعراضًا على الأوراق، وتخفض كلاً من نوعية وكمية المحصول. النباتات المصابة بالتبقع الحلقى تكون أكثر فقرًا فى إنتاج الأزهار عن النباتات السليمة ويسبب فيرس Vein mottle انكسار لون الأزهار.

استأصل Stone 1973 فيروسات Narcissus degeneration, Arabis mosaic من نبات

Narcissus tazette صنف جراند سوليل بواسطة زراعة المرستيمات القمية. الأبصال الخالية من الفيروس تنمو أسرع وأكثر قوة عن الأصل. الأزهار أكبر وأغنى فى اللون والسيقان أكثر فى النباتات السليمة عن المصابة.

وجد Walkey & Cooper, 1972 أن الأصناف التجارية من الراوئد فى بريطانيا تصاب بشدة بالفيروسات. ولم يتمكنا من تقدير تأثير الإصابة الفيروسية على قوة ومحصول هذه الأصناف؛ حتى أصبحت الأجزاء الخالية من الفيروس متاحة نتيجة لزراعة المرستيمات القمية. حوالى ٦٠ - ٩٠٪ حيث لوحظت زيادة فى محصول البتلات مقارنة بالنباتات المصابة بالفيروس.

من الممكن فى الفراولة أن تظل المادة النباتية «النواة» فى الأنابيب فى المعمل، وهذا يعنى أنه للحصول على الأعداد اللازمة من النباتات يجرى إكثارها فى المعمل، ويلاحظ أنه إذا اشتمل ذلك على طور الكالوس يجب عدم تجاهل حدوث الطفرات.

إن إنتاج بذور القنبيط يكون من أمهات مختارة بعناية، والتى تكون ناتجة من محصول متكاثر خضريا لعدة أعوام، تكون مصابة بشدة بالفيروسات، والذى قد يؤدى لخفض محصول البذور وموت النباتات؛ وباستعمال زراعة أنسجة القنبيط نجح Walkey سنة ١٩٧٤ فى إنتاج نوية خالية من الفيروس.

تمكن Gippert & Schmelzor, 1973 من استئصال الفيروسات من عدد من أصناف البلارجونيم باستعمال زراعة المرستيمات القمية. وعلى الرغم من أن الفيروسات لا تسبب أعراضًا على البلارجونيم، إلا أنه لوحظ أن النباتات الناتجة من المرستيم القمى كانت أقوى من العادية، وتعطى ٢٠-٣٠٪ حشات أكثر، بالإضافة الى تحسن فى القدرة على تكوين الجذور، وهكذا زاد الإنتاج حوالى ٣٥٪.

إن إخلاء الأصناف المهمة اقتصادياً فى المحاصيل التى تتكاثر خضريا من الفيروسات ليست كافية للوقاية من تأثير الفيروسات. فالأصناف تظل محتفظة بقابليتها للإصابة، ومن البداية يجب أن تهدف التدابير لمنع إعادة إصابتها. هذه التدابير تتحدد من ناحية وبائية الفيروسات، ومن ناحية أخرى بالمحصول الذى يكون ناميا إما فى الحقل أو فى الصوب، وقد

يحتاج أعوامًا عديدة كفترة زراعة .

فى بعض الحالات كما فى أشجار الفاكهه إعادة الإصابة بالفيروسات غير محتملة إذا كانت الجذور والأغصان خالية من الفيروس. وأيضًا إذا لم تتواجد نواقل للفيروسات. وفى محاصيل مثل القرنفل والكريزانثم والفراولة والبطاطس تكون مهددة بإعادة الإصابة عن طريق الحشرات أو ميكانيكا، والتى يمكن خفضها بواسطة تدابير صحية عديدة، وفى أى حالة يجب اختباره النبات الأم «أو النواة»، جماعيًا وفرديا لتواجد الفيروس. وهكذا يمكن اكتشاف إعادة الإصابة فى الحال.

ومن الواضح إن إعادة الإصابة لا تحدث فى النباتات الخالية من الفيروس، والتى نتجت من زراعة المرستيمات القمية، وظلت باقية فى الأنابيب وبهذا اقترح Boxus,1974 .

التسجيل ـ حفظ الأصول والمحصول : Indexing, Stock maintenance and yield

بمجرد تدعيم النباتات المنتجة فى التربة، يكون من الضرورى التأكد من خلوها من الفيروس. وحيث تظهران بعض الفيروسات تظهر متأخرة، فإن اختبار الفيروس يجب أن يجرى مرات عديدة اثناء السنة الأولى بعد الزراعة، وذلك قبل أن يستخدم النبات كمصدر. بالإضافة إلى أن هذه الاختبارات يجب ان تجرى على أمهات النباتات الخالية من الفيروس الباقية كمصدر.

تعتمد طريقة اختبار الفيروس على الصنف النباتى والتسهيلات المتاحة. فى الماضى كان يستخدم التطعيم والفحص بالميكروسكوب الإلكترونى للورقة والعصير النباتى، والنقل بالعصير إلى العائل القابل للإصابة، والاختبارات السيرولوجية المختلفة... كوسائل للاختبار. وحديثًا حيث تستخدم ELIZA والفحص بالميكروسكوب الإلكترونى للسيرولوجى توفرت طرق عالية الحساسية.

فى الماضى كانت النباتات المنتجة وكذلك اختبارات الخلو من الفيروس، توضع عمومًا فى تجهيزات مانعة للحشرات. وذكرت الدراسات الحديثة أن الأمهات الخالية من الفيروس يمكن تخزينها لأوقات طويلة بواسطة وضع الأنسجة المزروعة والمعقمة على درجات حرارة منخفضة

(Mullin & Schlegel, 1976)، وهذا التكنيك يكون أقل تكلفة واستهلاكًا للوقت.

ظهرت دلائل كثيرة على أن النباتات الناتجة من قمة المرستيم عادة تظهر قليلا أو لا تظهر اختلافات وراثية عن النباتات الأصل. ومن الضرورى اكتشاف أى تغيرات طفيفة فى الصفات الزراعية للنباتات الناتجة، فمثلاً الملاحظات السابقة أكدت أن تغيرات فسيولوجية قليلة قد تحدث كنتيجة لغياب الفيروس؛ ففى التفاح حدثت تغيرات قليلة فى لون الثمرة ووقت التزهير والأثمار، وفى الراوند سجلت تغيرات كبيرة فى كمية الحرارة المنخفضة اللازمة لكسر السكون (Case, 1973)، وبالتالى يجب أن يوضع فى الاعتبار اختيار الاجزاء المناسبة من ناحية الصفات الزراعية.

بمجرد اختبار الأم المناسبة وتكاثر النبات للإنتاج التجارى، يكون من الضرورى إجراء الاختبارات الحقلية لقياس المحصول الخالى من الفيروس كماً ونوعًا، بالإضافة إلى انه من المهم إجراء هذه التجارب لقياس معدل انتكاس الإصابة بالفيروس فى المناطق المختلفة. يتأثر معدل الانتكاس بوبائية الفيروس، تحت الدراسة ودرجة عزل المحصول السليم. وعموما يمكن القول أن الفيروسات المحمولة بالمن تكون أول ما ينتكس، خصوصًا إذا زرع المحصول السليم بجانب مصدر للفيروس.

إنتاج البطاطس الخالية من الفيروس بواسطة زراعة الأنسجة:

Production of Virus - free Potatoes by tissue culture

١ - مقدمة: Introduction

أ- نبذة تاريخية: Historical

تعتبر البطاطس **Solanum tuberosum** واحدة من أهم محاصيل الغذاء العالمية خصوصا فى المناطق الشمالية الباردة من العالم. سنة ١٩٣٣ سجل أكثر من ٦٠٠ صنف، وهى فى ازدياد عامًا بعد عام. وكثيراً ما تختفى أصناف عديدة تكون مرغوبة وذات إنتاج عالٍ لتدهورها تدريجيا فى القوة وكمية المحصول، قبل أن نكتشف أن هذا التدهور نتيجة الإصابة بفيروس أو أكثر. وعندما تسبب هذه أعراضاً مرئية يمكن أن نكتشفها،

ولكن الفيروسات الأخرى غير المظهرة للأعراض Symptomless تكون صعبة التشخيص والمقاومة. وبعد زيادة المعلومات عن فيروسات البطاطس تحسنت طرق الكشف عنها كثيراً، وأمكن معرفة أن كل الأصناف المهمة مصابة بواحد أو أكثر من الفيروسات المعتدلة أو الكامنة.

ب ـ خسائر المرض: **Disease losses**

بعد الحصول على البطاطس الخالية من الفيروس، أجريت التجارب لتقدير الفقد في المحصول الناتج عن الإصابة بكل فيروس على حدة. وكانت النتائج متغيرة، فكل صنف يختلف في حساسيته تجاه فيروس معين، وكذلك تضم الفيروسات لسلالات تختلف في شدتها.

ذكر Norris, 1953 أن الإصابة بفيروس PVX تسبب خسائر في المحصول، تتراوح بين ٥ ـ ٧٥٪ حسب سلالة الفيروس ـ والصنف ـ وعوامل أخرى، أهمها تواجد فيروسات أخرى كامنة ومختلطة مع PVX. مثل فيروس PVS وهو أحد الفيروسات التي لم تكتشف، حتى سنة ١٩٥١ عندما سجل في هولندا، ووجد أنه واسع الانتشار حيثما توجد البطاطس، ولا يوجد شك في وجوده غير مشخص في عديد من الأصناف المستعملة، وفيروسات أخرى عديد تؤثر في المحصول تشمل PVY, PVA.

تبعا لذلك استعمل تكنيك زراعة الأنسجة لإنتاج نباتات خالية من الفيروس في صنف كنج إدوارد، وتم مضاعفة الـ Clone الناتج ومقارنته بالعشائر المصابة بفيروس PVM، فوجد أن العشائر الخالية من الفيروس أنتجت نباتات قوية، ومحصولاً أكثر بنسبة ١٠٪ (Bawden & Kassanis, 1965) إلا أن التأثير المفيد لاستئصال الفيروس قد يقابله جزئياً زيادة القابلية للإصابة بالفطريات؛ فقد ذكر Muller & Munro, 1951 أن البطاطس الخالية من PVX & PVY عالية القابلية للإصابة للفطر *Phytophthora infestans*. كما وجد أن الدرنات الخالية من فيروس PVX إذا قتلت عرشها، وتركت ٢-٣ أسابيع في الأرض تكون أكثر قابلية للعفن الجاف Fusarium عن الدرنات المصابة بفيروس PVX، بينما التي حصدت بعد ٤ ـ ٥

أسابيع من قتل عرشها لم يلاحظ تغير فى قابليتها للإصابة. ومن هذه الملاحظات يعتقد أن الإصابة بالفيروس تغير الحالة الغذائية والفسيولوجية فى نبات البطاطس.

والإصابة بفيروس PVS, PVX عادة لا تظهر أعراضًا على البطاطس، وتسبب خسائر مؤثرة فى المحصول، وإنه بإجراء زراعة الأنسجة أمكن استئصال كل سلالات هذين الفيروسين. وأكثر من ذلك أن العشائر Clones الناتجة من زراعة المرستيم تكون خالية أيضًا من البكتريا والفطريات الممرضة.

جـ ـ طرق الاستئصال : Methods of Eradication

إن زراعة أنسجة براعم البطاطس كطريقة للحصول على نباتات خالية من الفيروس من أمهات مصابة، طورت لدرجة أصبح النجاح معها مضمونًا. تستعمل ثلاث طرق فى محاولة عزل الأنسجة الخالية من الفيروس التى يعاد زراعتها لتعطى جذورًا. الأولى تعتمد على ملاحظة أن تركيز الفيروس ينخفض فى الأجزاء الخضرية الحديثة عن القديمة فى النباتات المصابة، وبواسطة عزل المرستيم القمى أو قمة الجذر من النباتات المصابة وتنميتها على بيئة مغذية، أمكن الحصول على أنسجة خالية من الفيروس، ولكن هذه ليست دائما تعطى نباتات ذات جذور. والثانية باستعمال antimetabolites سواء بتطبيقها على النبات المصاب قبل فصل الدعم أو بإضافتها للبيئة المغذية ونلاحظ أن بعض الـ antimetabolites تخفض تركيز الفيرس، دون أن تضر أنسجة النبات، والثالثة هى تعريض النبات المصاب لحرارة قرب ٣٧ْم، والتى تخفض أو تثبط تضاعف بعض الفيروسات. والمرستيمات القمية المفصولة من النباتات المعاملة بالحرارة تكون غالبا خالية من الفيروسات، التى ليست من السهل استئصالها بزراعة المرستيمات وحدها.

٢ – زراعة المرستيم: Meristem

أ ـ أنسجة الزراعة : Tissues for culturing

عادة تختار لزراعة الأنسجة البراعم المرستيمية من طرف الساق أو عيون الدرنات أو إبط

الورقة. وتكون الأسبقية للفرع الابتدائي الذي تكشف، وذلك لأنه يحتاج فقط للاستطالة وإخراج الجذور فقط. وقد يكون لزراعة الأنسجة الأخرى قيمة عملية قليلة، ولكن يجب معرفة أي جزء من نبات البطاطس لازمًا لإنتاج نبات كامل.

اكتشف Bajaj & Dionne, 1966 إمكانية الحصول على نباتات خالية من PVX بزراعة جذور البطاطس، وتمكنا من تنمية ثلاث مزارع للجذور خالية من PVX، ونجحا سنة ١٩٦٨ في إنتاج تركيبات تشبه العقد على الجذور المنزرعة . وهذه التركيبات تميل للاخضرار ولكنها لا تنمو لتعطي أفرعًا.

لا تستعمل أنسجة الدرنات كمصدر للنبت الخالي من الفيروس، على الرغم من أنه درس نمو وتكشف الأنسجة البرانشيمية للدرنات.

وقد وجد Okazawa وزملائه سنة ١٩٦٧ أن الأوكسين ضروري لبداية تكوين الكالوس والكينتين Kinetin لاستمرار النمو والتكشف. عند زراعة قرص من أنسجة الدرنة X 16 ، 10 mm ، ينتج نبتة صغيرة جدا على سطح القرص. أعاد Anstis & Northcote, 73 زراعة قطع من الكالوس الناتج من أنسجة الدرنات ولكن لم تتكون الفروع، على الرغم من تكون الجذور على أحد الكالوسات.

وحتى الآن تجرى تجارب عديدة على السوق ـ الدرنات ـ الجذور وأنسجة البطاطس الأخرى لاكتشاف ظاهرة النمو بالكالوس، والتي تحتاج لتكشف أفرع ذات جذور لتصبح ذات أهمية عملية. والدراسات العديدة على تكشف الأنسجة أظهرت أنه، على الرغم من المجهود الكبير إلا انه لازالت هناك مشاكل عديدة دون حل، ويبدو أن استعمال الأنسجة له قيمة ضعيفة عن استعمال المرستيمات في استئصال الفيروسات.

ب ـ بيئة الزراعة : Culture media

تؤدى زيادة تركيزات العناصر الصغرى في البيئة المغذية إلى زيادة نجاح نمو المرستيمات المفصولة لنباتات ذات جذور (جدول ١١ – ٢) يوضح المعادن المستخدمة في بيئة

البطاطس، وفى عام ١٩٦٤ تمكن Morel & Muller من تحسين البيئة السابقة لهما (سنة ١٩٩٥) بالزيادة الكبيرة لكمية البوتاسيوم وإضافة سلفات الأمونيوم وحمض الجبريليك (GA_3). وضع Murashige & Skoog, 1962 البيئة (MS- 62)، والتى تتميز بزيادة الأمونيوم والبوتاسيوم، وتستمر وقتًا أطول أربعة أضعاف بيئة النيترات. وبمقارنتها ببيئات عديدة وضعت بواسطة Muth& Bode, 70, Stace - Smith & Mellor, 68 Christensen, 70 , Topio, 72 وجد أن احسنها هى (MS- 62). العناصر الصغرى (الدقيقة) التى عادة تستعمل فى المزارع. يضاف الحديد عادة فى شكل Fe - ethylenediamintetra acetic acid (Fe - EDTA) أكثر من صورة كلوريد الحديد أو السلفات. ذكر Shige & Skoog, 1962 أن العامل المخلبى (EDTA) يحسن كثيراً من قابلية الحديد للامتصاص وأيضا العناصر الصغرى الأخرى.

جدول ١١ - ٢ : العناصر المغذية المعدنية التى استخدمت فى بيئات عديدة لزراعة القمم المرستيمية للبطاطس.

		WHITE, 1954 (MANZER. 1958)	HELLER, 1953 (GAUTHERET, 1959)	MOREL and MARTIN, 1955 (PALUDAN, 1971)	MOREL and MULLER, 1964	MURASHIGE and SKOOG. 1962
العناصر الكبرى Macronutrienls:						
نترات الكالسيوم	$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	288		500	500	
نترات بوتاسيوم	KNO_3	80		125		1900
نترات صوديوم	$NaNO_3$		600			
نترات الأمونيوم	$NH4NO_3$					1650
كبريتات الأمونيوم	$(NH_4)_2 . SO4$				1000	
كلوريد بوتاسيوم	KCl	65	750		1000	
فوسفات بوتاسيوم	KH_2PO_4			125	125	170
فوسفات الصوديوم	$NaH_2PO_4 . 4H_2O$	19	125			
كلوريد الكالسيوم	$CaCl_2 . 2H_2O$		75			440
كبريتات المغنسيوم	$MgSO_4 . 7H_2O$	737	250	125	125	370
كبريتات الصوديوم	Na_2SO_4	200				
العناصر الصغرى Micronutrients:						
كلوريد الحديديك	$FeCl_3 . 6H_2O$		1		1	
كبريتات الحديديك	$Fe_2 (SO4)_3$	2.5		25		
كبريتات الحديد	$FeSO_4 . 7H2O$					27.8
	$Na_2 .$ EDTA					37.3
كبريتات المنجنيز	$MnSO_4 . 4H_2O$	6.7	0.1	0.8	0.1	22.3
حمض البوريك	H_3BO_3	1.5	1	0.025	1	6.2
كبريتات الزنك	$ZnSO_4 . 4H_2O$	2.2	0.8	0.04	0.8	8.6
يوديد البوتاسيوم	KI	0.75	0.01	0.25	0.01	0.83
موليبدات الصوديوم	$Na_2M_oO_4 . 2H_2O$					0.25
كبريتات النحاس	$CuSO_4 . 5H_2O$		0.03	0.025	0.03	0.025
كلوريد الالومنيوم	$AlCl_3$		0.03		0.03	
كلوريد النيكل	$NiCl_2 . 6H_2O$		0.03	0.025	0.03	
كلوريد الكوبالت	$CoCl_2 . H_2O$			0.025		0.025

المضافات العضوية فى بعض البيئات موضحة فى جدول (١١ – ٣) . اكتشاف الاحتياجات من المواد العضوية لزراعة الأنسجة صعب جدا، فبعضها يعتمد على الآخر فمثلا نحتاج لزيادة مادة ما عند إضافة مادة أخرى. ويعتمد الاحتياج لمواد أخرى على المغذيات المتاحة فى محلول المعادن أو على نوع وعمر الأنسجة المعزولة. وبالإضافة للمواد العضوية الموجودة فى جدول (١١–٣) يستعمل بعض الباحثين GA_3 . وقد وجد Mellor & Stace - smith, 69 أن GA_3 ليس له تأثير كبير على النمو، وقد حذف من البيئة الأخيرة لهما.

فى بعض الأصناف تعطى البراعم المفصولة كلها تقريباً نباتات، وفى أصناف أخرى تعطى نباتات قليلة جدا، والتى قد يتحسن نموها بإضافة GA_3. وجد Pannazio & Re-dolfi, 1973 أن إنتاج الجذور فى المرستيمات على البيئة MS - 62 السائلة دون إضافة GA_3 كان ١٧٪، وبإضافة GA_3 زادت الى ٦٦٪. وقد اقترحا أن الاختلاف بين نتائجهم والنتائج السابقة يكون بسبب اختلاف فترات الإضاءة – الموسم – الأصناف – عمر النبات الأم أو نقاوة الكيماويات، ويضاف احتمال آخر هو النقل الدورى للبراعم النامية الى بيئة طازجة.

كما وجد أن إضافة الفحم النشط الى MS - 62 تسرع من نموع البراعم المفصولة، وتزيد عدد النباتات ذات الجذور، ويكون مفيداً خصوصا للأصناف التى لا تعطى جذوراً على بيئة MS - 62.

وقد تدعم بيئة الزراعة ٥ر – ٨ر٠٪ آجار. وأحسن التجهيزات لزراعة المرستيم عبارة عن أنبوبة اختبار (12 X 100 mm) وبغطاء مقاوم للحرارة مصمم، بحيث يسمح بتغير الهواء فى الأنبوبة. وفى البيئات السائلة تدعم بقنطرة من ورق الترشيح، ولكنها غير ضرورية.

جدول (١١ - ٣): الإضافات العضوية (مجم/ل) للبيئات المستخدمة
في مزارع القمم المبرستيمية للبطاطس.

	WHIIE, 1954 (MANZER, 1958)	MOREL and MARTIN, 1955 (PALUDAN,1971)	MURASHIGE aad SKOOG, 1962
بيوتين Biotin		0.001	
كالسيوم بانتوثنيات Ca- Pantothenate		0.001	
ستيستين Cysteine		0.01	
جليسين Glycine	30		
اندول ٣ حمض الخليك Indol - 3 - acetic acid			
اينوسيتول Inositol		0.001	2.0
كينيتين Kinetin			1-30
نفثالن استيك Napthaleneacetic acid		0.001	100
نيكوتنيك اسيد Nicotinic acid	0.5		0.04-10
بيريروكسين Pyridoxine. HCl	0.1		0.5
تيامين Thiamine. HCl	0.1	0.001	0.5
جلوكوز Glucose		40000	0.1
سكروز Sucrose	20000		30000

جـ - عوامل التكشف وتكوين الجذور:

Factors in developmemt and rooting

١ - حجم البرعم المفصول: Size of excised bud

لوحظ أن حجم المرستيم المفصول يؤثر على تكوين الجذور، ولكن وجود Leaf primordia يؤثر أكثر في التكشف. باستعمال مرستيم بطول (١ر٠ مم) وجد Kassanis & Varma, 1967 أن النتائج كانت أحسن كثيراً عندما يشتمل على Leaf Primordia.

وجد Stace - Smith & Meller, 68 أن البرعم بطول ١ مم أو أكثر يكون جذوراً أكثر من البراعم الأصغر. إن حجم البرعم يؤثر أيضًا على استئصال الفيروسات خصوصا PVS. وعادة ترفض البراعم أقل من ٣ر٠ مم؛ لأنها لا تكون جذوراً، والآن ترفض البراعم أطول من ٧ر٠ مم لاحتمال إصابتها بالفيروسات. وفى هذا المدى الضيق للحجم هناك اختلافات قليلة فى تكوين الجذور.

٢ ـ الظروف البيئية للزراعة : Cultural environment

الظروف البيئية المستخدمة عادة فى زراعة مرستيمات البطاطس هى ٢٠ ـ ٢٣°م وإضاءة ٢٠٠٠ – ٤٠٠٠ لوكس لمدة ٢١ ساعة فى اليوم درس Pennazio & Redolfi, 1973 تأثير ثلاثة أساليب للإضاءة : لمبات غنية بالضوء الأحمر، لمبات إضاءة طول اليوم ، ٢:١ خليط من الاثنين فكانت عملية تكوين الجذور تحت كل أسلوب حوالى ٨١، ٤٣، ٦٧٪ على التوالى، وكذلك كانت النباتات تحت الضوء الخليط أكثر قوة، ولا يوجد اختلاف فى النسبة المئوية لتكوين الجذور تحت كثافة ضوئية ٢٠٠٠ – ٤٠٠٠ لوكس، ولكن نمو الأوراق والجذور كان أحسن على ٤٠٠٠ لوكس.

وهناك مقارنة لتأثير الحرارة على نمو المرستيمات فى أصناف عديدة، زرعت فى بيئة MS - 62 سائلة على ثلاث درجات حرارة . فعلى ٢٩°م بعض الأصناف نمت أسرع وأعطت جذوراً فى ٥ أسابيع، والنمو فى الأخرى كان غير طبيعى، الأوراق أكبر وسميكة وشاحبة اللون والجذور قليلة أو غائبة، وإذا لم تنقل هذه البراعم لبيئة جديدة تموت غالبًا. وعلى ٢٦°م النمو كان أبطأ، ولكن نمو الأفرع يسبق نمو الجذور . الأفرع عديمة الجذور تغرق فى البيئة السائلة، ويجب تدعيمها بقنطرة من ورق الترشيح لمنع غمرها وموتها. أما على ٢٣°م يبطؤ النمو جداً، ولكن الجذور والأفرع تنمو عادة فى وقت واحد.

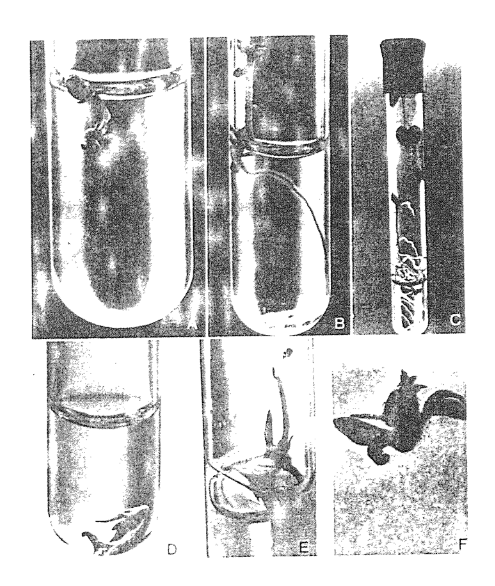
وإذا اصفرت البراعم يمكن نقلها لبيئة طازجة دون قنطرة ورق الترشيح، وإذا لم تنقل تظل متوقفة عن النمو لعدة أشهر، وتستعيد نموها النشط عند نقلها لبيئة طازجة . بعض الأفرع عديمة الجذور، والتى غرقت فى البيئة السائلة تصبح رفيعة وتتشوه ثم تتلف (شكل ١١ – ٤) . وهذه يمكن رفعها بورق الترشيح أو بتطعيمها على جذور طماطم. وقد وجد

Morel & Martin, 55 أن النباتات النامية على آجار غالبًا تتعفن عندما نقلها للتربة، ولكن السوق المقطوعة والمطعومة على نبات طماطم صغيرة جيدة وتؤخذ خلال شهر، وهى ذات جذور. وقد تمكن Mellor & Smith. 1969 من إسراع إخراج الجذور للأفرع، بواسطة قطع جزء رقيق من القاعدة، ثم تعريض السطح المقطوع لهرمون جذور، ثم الزراعة فى رمل أو تربة.

٣ ـ عوامل أخرى: Other factors

كما وجد فى بعض الأحيان أن اختلاف الأصناف يحدد معدل النمو فى المزارع؛ حيث لاحظ، Quak 1961 أن بعض أصناف البطاطس لا تنمو جيداً على البيئة التى تكون مناسبة جداً لأصناف أخرى. وقد وجد أيضًا أنه فى أصناف عديدة براعم قليلة، تتكشف لتعطى أفرعًا وجذوراً خلال شهرين من الفصل، بينما فى أخرى وتحت ظروف الزراعة نفسها تستغرق ٤ ـ ٦ شهور، مع تجديد المزرعة مرة أو مرتين.

البراعم المأخوذة من فرع واحد تختلف أيضًا فى نموها. فمثلاً يكون الموقع على الفرع واحداً وحجم البرعم (٣ر ـ ٧ر م)، ولكن بعد شهرين من القطع يعطى برعمًا أو اثنين أفرعًا وجذوراً وأوراقًا لها لون طبيعى، بينما الأخرى تعطى أوراقًا صغيرة شاحبة، ودون أفرع أو جذور، ونقل الأخيرة الى بيئة طازجة غالبًا ما يسبب موجة من النمو الضعيف.



شكل (١١ – ٣): التكشف الطبيعى وغير الطبيعى لبراعم بطاطس فى بيئة سائلة. الخطوات المتتابعة أثناء عملية التكشف مبينة فى (A ـ C) بعض البراعم تغرق وتموت عند تمددها على كوبرى من ورقة الترشيح (D - E) وبرعم بعد نقله إلى ورق ترشيح بدأ يستكمل تكشفه (F).

بمجرد خروج الجذور تستمر النباتات في النمو دون نقل حتي تزدحم أنبوبة المزرعة بالجذور، التى تلتف الأفرع على قمتها .ويمكن الاحتفاظ بالنباتات لمدة غير محدودة بواسطة نقل قمة الفرع (طول ٢ - ٣سم) إلى بيئة جديدة على فترات كل ٤ شهور، أو عندما تقترب البيئة فى الأنبوبة القديمة من الجفاف، وفى الحرارة المنخفضة يقلل الفصل وتطول المدة بين كل تجديد.

٣ - استئصال الفيرس: Virus Eradication

أ - العوامل التى تؤثر على الاستئصال: Factors influencing eradication

١ - مضادات البناء الحيوى: Antimetabolites

تشير مراجع زراعة الأنسجة الى فائدة antimetablites فى بيئة الزراعة. أجريت بعض التجارب على مزارع الكالوس وأخرى على قطع من عقل الساق، ولكن الأغلب على المرستيمات القمية. بعض antimetabolites فى تركيز لا يضر النبات يثبط تضاعف PVX، ولكن تقارير قليلة نشرت عن الاستئصال، ذكر Noris ١٩٥٤ أن PVX قد يستأصل بعد المعاملة بواسطة مالاكيت أخضر malachite green بينما تظل أغلب براعم المعاملة مصابة، ولكن فى عديد منها يتأخر ظهور الفيرس، وواحد فقط يصبح خاليًا من PVX. استعمل Vasti 1973. مرستيمًا قميًا بطول ٣ - ٤ مم مع malachite green أو الثيويوراسيل فى البيئة. وعند إضافتها للبيئة مفردة فإن كل الستة نباتات malachite green ونباتين مع ثيويوراسيل أصبحت خالية من PVX، وعندما تعامل القمم المفصولة بخليط من الاثنين، كانت كفاءتهما أقل.

٢ - حجم البرعم المفصول: Size of Excised Bud

حجم المرستيم المفصول له أهمية قصوى فى تحديد النجاح؛ خصوصا فى PVS&PVX، قطع Kassanis & Varma, 1967 مرستيمات بطول١ر٠ مم، وبدون أو مع Leaf primor-dium، ولاحظا أن ٢٠/١٩٦ فقط برعم تكشفوا لنباتات، ولكن ١٩ منها كانت خالية من الفيروس.. فصل Accatine, 1966 مرستيمات معها اثنين من Leaf primordia، وذكر أن

كل ١٨ نباتًا كانت خالية من فيروسات PVM - PVY - PLRV، ولكن ستة فقط منها كانت مصابة بفيروس PVX و١٥ بفيروس PVA.

جدول (١١ – ٤) : تأثير إضافة مضادات البناء الحيوى إلى البيئة الصناعية على تثبيط فيروس البطاطس في القمم المفصولة.

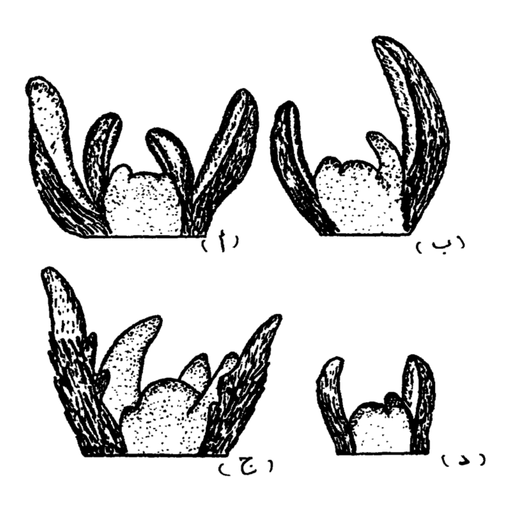
	مضاد البناء الحيوى	التثبيط	الاستئصال	المؤلــف
١٠	أخضر ملاكايت	+	+	NORRIS, 1954
٥	أخضر ملاكايت	-	-	THOMSON, 1956
١ – ٢	أخضر ملاكايت	-	-	MANZER, ,1958
١ – ٢	ثيويوراسيل	-	-	MANZER, ,1958
٣ – ٤	٢ر٤ داى كلورو	+	+	QUAK, 1961
٠ر٥ – ٠ر٧	فينوكس حمض الخليك	+	+	VASTI,1973
	أخضر ملاكايت	+	+	VASTI,1973
	ثيويوراتيل	-	-	PENNAZIO,1973
	أزجوانين	-	-	PENNAZIO,1973
	فلويوراسيل	-	+	PENNAZIO,1973
	ثيويوراتيل	-	-	PENNAZIO,1973
	فلوروفينايل	-	-	PENNAZIO,1973
	الانين	-	-	PENNAZIO,1973

لاحظ Kassanis & Varma, 1967 إن أصناف البطاطس المختلفة لها مرستيمات ذات أشكال وأحجام مختلفة. وقد وجد أنه فى الفرع الواحد قد يختلف الحجم الذى يوصى به فى المراجع. يختلف اختيار حجم البرعم، فبعضهم يأخذ بالطول الكلى والاخرون بعدد leaf primordia. وكلا الاختيارين يعطيان فكرة تقريبية عن حجم الأنسجة اللازمة.

شكل (١١ – ٦) يوضح أنواعاً من المرستيمات وصعوبة تحديد حجم كل منها، ففى شكل (٥–١١) يظهر برعم جانبى ذو اثنين من leaf primordia وأربعة من rudimentray leaves وإزالة الاخيرة فقط تجعل طول المرسيتم حوالى ٠,٢ مم. وشكل (٥–١١) يوضح برعماً جانبياً أيضا له اثنان من leaf primordia، واذا تركنا الاثنان يصبحان أصغر من البرعم الأول. ايضا اختيار حجم المرسيتم الطرفى صعب. والبرعم الطرفى عادة أكثر فى العرض عن الطول، ويحاط بواسطة whorl of leaf priimordia، (شكل ١١–٦–أ) .. ومن غير المرغوب فيه الحجم الكبير للأنسجة والعدد الكبير من leaf primordia. يوضح شكل (١١–٦–د) البرعم الجانبى لنباتات البطاطس بعد عدة أشهر من الزراعة، وهناك أكثر من ٦ براعم على النبات الواحد، والتى تتميز بصغرها وتجانسها فى الشكل والحجم. ومثل هذه النباتات تمد الباحثين بالمادة النباتية الموحدة للمرستيمات لزراعتها تحت الظروف المختلفة.

٣ – المعاملةالحرارية : heat treatment

المعاملة الحرارية للنباتات المصابة قبل فصل البراعم، تسهل استئصال بعض الفيروسات التى من الصعب استئصالها بزراعة المرستيم وحده. وبعد المعاملة الحرارية تصبح براعم كثيرة نسبيا خالية من الفيرس، والتى تستعمل عادة فى الزراعة. ومن فيروسات البطاطس التى يصعب استئصالها- PVX - PVM - PVY - PVA - PLRV Aucuba masaic - PSTV PVS , PSTV ، وكل هذه تشمل سلالات تتميز بمقاومتها للمعاملة الحرارية عن الاخرى. مثلاً Kassanis, 1970 استأصل PLRV من كل الدرنات بواسطة المعاملة الحرارية وحدها، بينما وجد – Mellor& Stace smith, 1971 سلالات من PLRV تظل باقية بعد المعاملة الحرارية وزراعة المرستيم، كما وجدا أن PVY& PVA غالباً ما تستأصل بزراعة المرستيم دون المعاملة المسبقة بالحرارة.



شكل (١١-٤): رسومات تبين القمة المبرستيمية والأوراق حولها أ و ب تمثل براعم جانبية و جـ برعم طرفي به قمة مبرستيمية كبيرة وعدد أكبر من الأوراق البدائية (بريموررديا) و د: برعم جانبي من النبت Plantlet بعد عدة أشهر من زراعة. الخط الوسطى بين جـ ، د ٢,٠مم.

وجد Morel et al (1968) ان هذين الفروسين يستأصلان من ٨٥–٩٠٪ من المرستيمات بينما PVS & PVX أقل من ١٪ فقط. ولكن Kassanis (1965) وجد أن PVA بقى فى ٣٩/٣٩ نبات نمت من براعم قطعت بعد معاملة ١٢ – ٢٠ يوم على ٣٧°م. وتقارير أخرى أكدت أن PVA بقى فى نباتات أخليت من PVX.

لم تجد معلومات منشورة عن aucuba mosaic فى البطاطس، ولكن لدينا نتائج لأبحاث أولية على نباتات تكشفت عن مرستيمات سبق تعريضها للحرارة؛ حيث ظل ٤/٧٥ نبات مصابًا فقط.

الفيروسان PVX, PVS نادرة الاستئصال دون أن تفصل البراعم وهى صغيرة جداً أو تعامل النباتات المصابة بالحرارة قبل فصل البراعم. قارن Mellor & Stace - Smith, 1970 سهولة استئصال PVS, PVX من ٢١ نبات مصاب بكلا الفيروسين، وقد وجدا أن PVX عادة أكثر تأثراً بالمعاملة الحرارية عن PVS، حيث يبقى فى حوالى ٣٪ من البراعم المفصولة بعد ٤ – ٦ أسبوع من المعاملة الحرارية ونادراً بعد معاملة أطول، وقد وجدا أن أكثر سلالات PVX تحملا للحرارة تبقى فى ٣٪ من البراعم المفصولة بعد معاملة حرارية ١٠ أسابيع.

فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس أكثر صعوبة فى الاستئصال فقد فصلت براعم فى نباتات مصابة بحدة بالفيرويد، بعد معاملة حرارية ٢ –١٤ أسبوع فظلت الإصابة الحادة فى ٦٢ من ٦٦ نباتًا، أما الأربعة الباقية فاصبحت معتدلة الإصابة. واستعمل واحد من الأربعة كمصدر فى التجارب التالية. والبراعم التى فصلت بعد ٢ –١٢ أسبوعًا من المعاملة وجد ان معدل الاستئصال صغير جدا ٦ /٢٤٨ فقط. النتائج المختلفة لمحاولات الاستئصال فى الفيروسات اقترحت أن هذا المصدر للفيرويد قد يكون غيرعادى المقاومة للحرارة، وأن الفيرويد من مصادر أخرى قد يكون أقل صعوبة فى الاستئصال. درجة الحرارة واستمرار المعاملة الحرارية استخدم بواسطة عديد من الباحثين، عندما تكون درجة الحرارة ٣٧°م يكون الاستمرار ٣ أسابيع أو أقل، حيث يتحدد ذلك بمدة بقاء درنات البطاطس حية والانخفاض الطفيف فى درجة الحرارة يزيد البقاء كثيراً، أخبر Mellor & Stace - Smith (1967) بقاء الدرنات وكذلك تكشف النباتات من الأجزاء الجذرية فى درجات الحرارة المختلفة ووجد

تغير حرارة الهواء يومياً من ٣٣ – ٣٧ْم وحرارة التربة من ٣٠ الى ٣٣ْم تبقى الدرنات حوالى ١٠ أسابيع والأجزاء الجذرية أكثر من ٦ شهور. وبعد ٤ شهور معاملة تتكشف بعض النباتات الخالية من PVX من قطعة نسيج كبيرة نسبيا. وتزيد النسبة بطول المعاملة الحرارية.. ففى الأجزاء الجذرية تكون الأفرع النامية أثناء المعاملة رقيقة، والبراعم الجانبية صغيرة، وذات عدد قليل من الأوراق الأولية Rrudimentary leaves. أما النامية من أجزاء درنات فتكون أفرعًا قوية وبراعم جانبية سميكة، كل منها ذات أوراق أولية عديدة قد تزال قبل فصل البراعم.

٤ ـ الإصابة المتضاعفة (المشتركة) : Multiple infection

حصل Pannazio, 1971 على نتائج متعارضة عند زراعة مرستيمات من نباتات معاملة بالحرارة فى صنفين .. ففى أحدهما المصاب بفيرس PVX فقط ٣٤/٤٢ نبات كانت خالية من الفيروس. وفى الاخر المصاب بفيروسات PVX - PVS-PVM -PVY فكان ٢ / ٣٤ نباتًا خاليًا من PVY، كلها من PVM، واغلبها من PVS & PVM وقد عزى صعوبة استئصال PVX من هذا الصنف للإصابة المشتركة للأربعة فيروسات.

درس Close, 1964 تأثير فيروسات عديدة على تركيز PVX وتضاعفه وحركته داخل النبات وعلاقة ذلك بالحرارة. فوجد أن تركيز PVX يزيد فى وجود PVY عما يكون وحده خصوصا على ٣١ْم. وعلى هذه الحرارة يقل تضاعف PVX ولا يتحرك جهازيًا، ولكن بوجود PVY يستمر فى التضاعف ويتحرك جهازيًا.. ويزيد تركيز PVX حوالى ٦٤ مرة. ويبدو أن ملاحظات Close تتوافق مع افتراض Pennazio فاحتمال وجود PVY أثناء المعاملة الحرارية مسئول عن وجود PVX أيضًا حتى ولو استأصل PVY فيما بعد بفصل البراعم الصغيرة، رغم أن PVX سجل فى القبة المرستيمية فى براعم البطاطس، ولم يسجل PVY عندما زرع Mellor & Stace - Smith مرستيمات من نباتات معاملة بالحرارة فى ١٨ صنف، كان الاستئصال يتراوح بين ٥٤ – ١٠٠٪ حسب نبات المصدر.

ب ـ الاستئصال أثناء الزراعة : Eradication during culture

إن تكنيك إنتاج نباتات خالية من الفيرس بواسطة تكاثر المرستيمات المفصولة من

النباتات المصابة يعتمد على نظرية أن الفيروسات لا تتوزع بانتظام داخل عوائلها، ولهذا فإن قطعة صغيرة من الأنسجة قد تكون خالية من الفيروس، وهناك فكرة أخرى أن تركيز الفيروس ينخفض بالقرب من قمة الأفرع والاختبارات لتقدير امتداد الفيروس فى المناطق الطرفية كانت غير كافية، Kassanis, 1967. كان أول من اقترح أن الاختبار بالميكروسكوب الإلكترونى للمرستيميات الطرفية قد يحدد وجود جسيمات الفيروس Appiano & Pen-nazio,72 ، وباستخدام القطاعات الرقيقية والميكروسكوب الإلكترونى كشفا وجود PVX فى سيتوبلازم الخلايا الطرفية للبطاطس. وقد وجدوا جزيئات فى كل المرستيمات التى اختبروها، ولهذا أكدوا أن استئصال الفيروس يتم أثناء الزراعة. هذه الملاحظات أكدها Krylova et al,1973 بواسطة الفحص بالميكروسكوب الإلكترونى للعصير المتجانس للمرستيمات المصابة بفيروس PVX. وقد فحصوا المرستيمات فى ثلاثة أحجام، وقد وجدوا جزئيات قليلة فى ٩٨ / ١٠٠ فى الطول (٠٨، – ٠,١)، وأكثر قليلا فى (٠,١ – ٠,٣) وكثيرا فى المرستيمات (٠٣، – ٠٥،م). وأيضاً فحصوا عصير المرستيمات بعد ٤ أسابيع من الزراعة، ووجدوا أن القطع المزروعة الأقل من (٠,١م) كانت خالية، وفى الطول (٠,١ –٠,٣م) كانت قليلة جداً وقد تأكدت هذه الملاحظات بالحقن الميكانيكى.

ميكانيكية استئصال الفيروس أثناء الزراعة غير معروفة. اقترح Ingram 1973 أنه ربما يكون السبب إما بعض العوامل المثبطة التى تنتج أثناء الاستزراع، أو تأثير بعض مكونات البيئة على الفيروس. واقترح Quak أن اختفاء جسيمات الفيرس قد يعزى إلى تفاعل المرستيم مع بيئة المزرعة.

ويميل الرأى لنظرية أخرى قد تكون أكثر احتمالاً. إن تضاعف الفيروس يحتاج إنزيمات، والتى تكون متاحة للخلايا قرب قمة المرستيم، وعند قطع قمة صغيرة تختل مؤقتاً عمليات النمو، وتصبح الإنزيمات المطلوبة لخطوة أو أكثر فى تضاعف الفيروس غير متاحة، وهكذا يقف إنتاج جسيمات جديدة. فى البراعم الصغيرة يكون الاختلال كبيراً وقد تطول فترة عدم الاستقرار فى تضاعف الفيروس للحد الذى يتحلل عنده الحمض النووى الفيروسى Viral RNA ، ومن الممكن أن تنتفع به خلية العائل. ولكن فى البراعم الكبيرة يكون

الاختلال أقل، وتصبح الإنزيمات متاحة، قبل أن يتحلل كل Viral RNA .

جـ - الاستئصال الناجح : Successful eradication

١ ـ الكشف عن الفيروس : Virus detection

حيث إن البطاطس معرضة للإصابة بعديد من الفيروسات غير المرتبطة، وكل منها له سلالات تختلف في الشدة يكون من الصعب، جداً تعريف والكشف عن هذه الفيروسات. وعلى ذلك فإن وسائل الحقن الميكانيكى ـ النقل بالمن ـ السيرولوجى ـ الميكروسكوب الإلكترونى ـ الإلكتروفورسيس Electrophruses كلها تصبح مطلوبة. إذا كان الهدف هو إنتاج Clone خالٍ من الفيروس، لا يكون من الضرورى معرفة أى الفيروسات موجودة قبل المعاملة ولكن يجب تسجيل نبات المصدر، إن استخدام نبات مفرد كمصدر والمعلومات عن محتواه من الفيروسات توضح الاختبارات التى يجب أن تجرى لتحديد أى فيروسات لازالت باقية، ولهذا السبب نحتفظ بنبات من المصدر غير معامل للمقارنة.

من الخبرة السابقة أكثر الفيروسات إصابة هى PVS & PVX، وللكشف عن هذه يستخدم الحقن الميكانيكى على *Chenopodium amaranticolor & Gomphrena globosa* حيث يعطى PVX أعراض موضعية على الأخير مبكراً وغامقه أكثر من PVS ويحتاج الكشف عن PVS فى وجود PVX للسيرولوجى ونتائج الاختبارات السيرولوجية لفيرس PVS أحياناً غير مؤكدة ويجب عمل مقارنة واضحة السيرولوجى أو الحقن الميكانيكى على النباتات المشخصة يمكن استعمالها للكشف عن PVY - PVA - PVM aucuba mosaic سلالات فيرس التفاف أوراق البطاطس التى تعطى أعراض مرئية على البطاطس نادرة الوجود، وحيث إن PLRV لا ينتقل ميكانيكياً فإن السلالات الغير مظهره للأعراض يمكن الكشف عنها فقط بالنقل بالمن إلى *Physalis floridana*، وللكشف عن السلالات المعتدلة يختار البادرات المتجانسة وتنمى تحت ظروف بيئية محكمة، وقد نجح Murayam et al, 1973 فى تنقية PLRV وتحضير انتسيرم ومن الممكن استعمال السيرولوجى فى الكشف عن PLRV فى العصير الخام للبطاطس المصابة، الكشف عن فيرويد الدرنة المغزلية فى البطاطس يقابله صعوبات النقل إلى بادرات الطماطم مفيد ولكن تظل السلالات المعتدلة دون كشف

بدون Challenge inoculated مع سلالة قوية (Fernow, 1967).

وقـد طور Morris & Wright, 1975 تكنيك يشـمل استـخلاص الأحـماض النووية الخلوية وفصلها بواسطة Polyacrylamide gel electrophoresis، وهو يعتمـد فى الكشف عن السلالات المعتدلة من PSTV.

٢ – الأصناف الخالية من الفيروس: Virus - free cultivars

كان Morel & Martin, 1955 أول من استعمل زراعة المرستيم لاستئصال الفيروسات من البطاطس ومنذ ذلك الحين، طبق هذا التكتيك فى عديد من البلدان تشمل أمريكا - فرنسا - بريطانيا - الدنمارك - ألمانيا - فنلندا - اليابان - إيطاليا - كندا.

جدول (١١- ٥): تأثير المعاملة الحرارية وحجم البرعم على تخليص النباتات من فيروسات X, C, Y، S البطاطس.

أجزاء البطاطس	المعاملة الحرارية		طول النمو م	استئصال الفيروس		المؤلف
	درجة الحرارة	فترة التعريض بالأسبوع		PVX	PVS	
الدرنات	٣٥-٣٢°م	صفر – ١,٥	٠,٢–٠,١٥	٦/٤	٦/١	MCD
أجزاء جذبية	٣٧-٣٣م	صفر	٠,٥–٠,٣	٩/٦	٩/١	M,S
نباتات نضجة	٣٥-٣٣	صفر	٠,٤	٥٩/٧		P
		٣	٠,٤	٤٢/٣٤		
أجزاء ذات جذور	٣٧-٣٣م	صفر	١-١,٦	صفر/٣٢	صفر/٣٢	
	٣٧-٣٣م	٤-٢	١-٠,٦	٨/٣	٨/١	S&U
		٨-٦	١-٠,٦	١٤/٩	١٤/١	
درنات منبتة	٣٧°م	صفر				T
		٣			١٩/٦	
درنات منبتة	٣٧°م	صفر			٢٧/٢٣	
		٢-١,٥			٦/٥	T

رموز المؤلف:

MCD: MacDonald 1973.
S, S. M.: Stace Smith and Meller 1968.
P.: Pennazie, 1971.
T: Tapie 1972.

أصبحت العشائر Clones الخالية من الفيرس فى كل الأصناف المهمة متاحة الآن. جدول يوضح ذلك من التقارير المنشورة، وهذا الجدول غير مكتمل تمامًا، ولكنه يؤكد نجاح هذه الطريقة.

ملخص الطرق الموصى بها

Summary of Recommended Methods

يمكن الحصول على النباتات الخالية من الفيروس من درنات البطاطس بواسطة الطريقة الآتية:

زراعة قطعة من الدرنة ذات عين مفردة فى تربة تحت الظروف العادية. عندما يخرج أول نبت، وبطول ١٥ سم، يقطع القمة بطول ٦ –٨ سم، وتزال الورقتان السفليتان ويعامل السطح المقطوع بهرمون الجذور. يزرع الجزء المقطوع فى اوانٍ من البيت قطر ١٠سم معقمة، وتغطى بناقوس زجاجى لمدة ١٠ أيام. تكون أوانى البيت متماثلة النسيج، ويجب التأكد من أن حرارة التربة أقل من حرارة الهواء اثناء المعاملة، وكذلك صرف وتهوية التربةجيدان، كل هذه تساعد على التعمير تحت المعاملة الحرارية. وأخذ قطعة أخرى يكون بعد أسابيع قليلة، وهذا مفيد لاحتمال موت الأول أثناء المعاملة الحرارية. ويحتفظ بالنبات الأصل للمقارنة مع النباتات المتكشفة فى المزرعة بعد ٣-٤ أسابيع من الزراعة، ينقل لحجرة نمو حيث إضاءة (3000-4000 LUS) لمدة ١٦ ساعة يوميًا وحرارة الجو ٣٦ْم أثناء النهار، و ٣٣ْم أثناء الليل، وبعد أسبوعين تطوش قمة النبات الصغير ليسمح بنمو الفرع، ويترك على النبات على الأقل ورقتان لتشجيع النمو مرة أخرى. تقطع الأوراق من الفرع المفصول، ويترك قطعة صغيرة من كل عنق ورقة، ويلف الفرع فى ورقة مبللة لمنع الذبول. تعقيم الفرع غير ضرورى، ولكن فصل البرعم يتم تحت ظروف معقمة، ويجب تعقيم الأدوات بعد كل قطع بواسطة الغمر أولاً فى الكحول ثم الماء المعقم. وتحت تكبير ٢٥ X يفصل كل برعم بالدور. تشد نهاية الجزء الباقى من عنق الورقة لكشف البرعم الجانبى، وبواسطة الإبرة تكسر الأوراق الأولية، ويترك فقط أصغر اثنين من Leaf Primordia. وبواسطة نصل حاد يقطع المرستيم القمى، ثم بالإبرة ينقل إلى سطح البيئة المناسبة. يجب ان يكون البرعم بطول ٠,٣–٠,٦مم.

والبراعم الأصغر فرصتها فى البقاء أقل . والأكبر تصبح أكثر إصابة بالفيرس. توضع المزارع على ٢٣ْم، وإضاءة ١٦ ساعة يومياً.

كل فرع يعطى ٨ ـ ١٢ برعماً، بعضها يتكشف ليعطى نباتات خالية من الفيروس. وحيث إن بعض الأصناف لا تعطى جذوراً وبعض سلالات الفيروس تكون غير عادية البقاء. لتأكيد النجاح يؤخذ فرع آخر (لغرض فصل البراعم) بعد ٢ ـ ٤ أسبوعاً من المعاملة. بعد ٢ ـ ٣ شهورمن الزراعة تصل إلى طول ٣ سم أو أكثر يمكن نقلها إلى التربة، ولكن هناك نقطة حرجة فعند إزالتها من الأنبوبة، تكون طرية وغضة جداً وتذبل، إذا لم تحمى بسرعة من فقدالرطوبة .واذا كانت التربة مروية بعناية وترش النباتات برقة بالماء وتغطى بناقوس زجاجى لمدة أسبوع، يكون النجاح مؤكداً. عادة يكشف عن إصابة النباتات عند نقلها للتربة فتؤخذ ورقة واحدة ٣ـ٥ سم فى القطر الى نقطة ماء، تستعمل للحقن على العوائل المشخصة G.globosa ، C.amaranticolor، والنتائج السلبية لهذا الاختبار يجب أن تؤكد بعد عدة أسابيع بإعادة الحقن أو بالسيرولوجى والميكروسكوب الإلكترونى.

نظره على علم الفيروسات النباتية
فى الماضى والحاضر والمستقبل

وقد أوضحت فى هذا الكتاب المعلومات الحالية فى مجال علم الفيروسات النباتية ويهمنا فى هذا الفصل الأخير من الكتاب أن نلقى نظره على التطور التاريخى لهذا العلم وكذا على التطورات المتوقعة فى هذا العلم خلال القرن الحادى والعشرين.

نظرة على الماضى:

وقد تم تقسيم المائة سنة الماضية التى تم فيها البحث فى مجال الفيروسات النباتية إلى خمسة فترات ومع أنه من الممكن أن يحدث تداخل بين هذه الفترات إلا أنها تعطى لحد كبير فكرة عما تم بحثه من موضوعات فى كل فترة فيها.

١ ـ ١٨٩٠ ـ ١٩٣٥ وكان النشاط الأساسى فى هذه الفترة هو اكتشاف الفيروس كمسبب مرضى جديد يصيب النباتات واكتشاف حقيقة أن هذا المسبب يمر من المرشحات

التى تحجز أدق البكتريا وأطلق عليها حينئذ الفيروسات المرشحة. ولكن ظلت طبيعة هذا المسبب غير معروفة وظلت عدم القدرة على التمييز بين الفيروسات نفسها وبين الأمراض التى تسببها.

٢ – ١٩٣٥ – ١٩٥٠ وقد تم عزل الفيروس سنة ١٩٣٥ وظهر أنه عبارة عن رايبو نيوكلوبروتين سنة ١٩٣٦ وفى السنوات التالية تم اكتشاف وعزل عدد كبير من الفيروسات وتم دراسة خواصها الطبيعية والكيميائية وقد ظهر أنها جميعها تتكون من وبروتين وفى سنة ١٩٥٦ تم التوصل إلى أن الحمض النووى RNA بمفرده قادر على العدوة.

٣ – ١٩٥٦ – ١٩٧٠ وهنا تم اكتشاف الفيروسات النباتية الشامنة ذات الحمض النووى DNA ثنائى الخيط (ds DNA) وكان التقدم الأهم فى هذه الفترة هو استخدام الميكروسكوب الاليكترونى فى دراسة الفيروسات النباتية وحدث لتطور كبير فى الميكروسكوب الاليكترونى وكذا فى طرق تحضير العينات للفحص. وقد سمحت طريقة الصبغ السالب برؤية بعض تراكيب الفيروسات المنقاه. كما سمحت فحص القطاعات فائقة الدقة إلى دراسة تأثير بعض الفيروسات على الخلايا النباتية.

٤ – ١٩٧٠ – ١٩٨٠ وقد أدى التطور الكبير فى استخدام أشعة X عالية القدرة على إظهار التركيب ثلاثى الأبعاد للغطاء البروتينى لبعض الفيروسات كما أدى التقدم فى دراسة البروتربلاست إلى تقدم ملحوظ فى دراسة الطريقة التى تتضاعف بها الفيروسات داخل الخية. كما أدت الدراسات in vitro على RNA الفيروس إلى إعطاء بعض المعلومات عن استراتيجية جينوم الفيروسات النباتية.

٥ – ١٩٨٠ – ١٩٩٠ وهذه الفترة تميزت بالتقدم الذى حدث فى معرفة التتابع النيوكليتدى فى الجينوم الفيروسى وكذا القدرة على إنتاج cDNA معدى من نسخ من الـ RNA فى الجينوم الفيروس RNA مما سمح باستخدام تكنيكات التركيب الجينى. وقد أظهر لنا التتابع النيوكليتدى بتفهم لتركيب الجينوم لمعظم مجموعات الفيروس النباتية. كما تقدمت طرق تشخيص الفيروسات التى تعتمد على تهجين الحمض النووى. كما

تزايدت الآمال لابتكار طرق حديثة لمقاومة الأمراض الفيروسية التى تعتمد على إدخال أجزاء من الجينوم الفيروس إلى نباتات بعض المحاصيل.

نظرة على المستقبل فى علم الفيروسات

من المنتظر أن يتسع مجال الدراسات فى القرن القادم سواء فى النواحى الأساسية أو العملية وأن يكون هذا المجال غير محدوداً وهذا يتأتى نتيجة للتطور المذهل الذى يحدث فى التكنيات القائمة على أساس تكنولوچيا تحديد الچينات.

دراسات على التركيب البنائى:

لقد أدى استخدام التحليل بواسطة أشعة X المبلورة إلى زيادة معلوماتنا عن التركيب الدقيق لبعض الفيروسات الصغيرة ومع ذلك فإن هذا التكنيك يجعل مسألة التطفير الموضعى ممكنًا عن طريق إحلال حمض أمينى محل أخر فى البروتين الفيروسى. وحيث من الممكن أن يؤدى إلى المزيد من تفهم تفصيلاً لديناميكيه العلاقة بين التركيب والوظيفة فى الكابسيد البروتينى سواء المبنى أو غير المبنى.

تضاعف الفيروسات:

كثير من الأمور مازالت غير مفهومة فى عملية تضاعف الفيروسات:

١ - مثل مناطق التضاعف - وقت التضاعف والميكانيكية التى تم بها تخلص الچينوم الفيروسى من غلافه البروتينى بعد حقنه.

٢ - مناطق وميكانيكية تجمع الفيروسات in vivo من حزمة من الأحماض النووية والبروتين.

٣ - الميكانيكية التى بواسطتها الحمض النووى المحقون يستقر وينظم مواطن التضاعف داخل الخلية والتى قد يتعرض بعضها إلى حدوث تغييرات فى بعض أعضاء العائل.

٤ - دور عضيات (مكونات) خلية العائل فى تضاعف الفيروس.

٥ - الطريقة التى يتم بها تحويل كلى أو جزء من جهاز تمثيل البروتين فى خلايا العائل.

٦ - الطريقة التى يمتاز بها تستطيع الفيروسات توجيه العمليات البنائية فى الخلية لإنتاج المركبات اللازمة لتمثيل الفيروس.

٧ - كيف يتم التنسيق بين الوقت. الموضع الذى يتم فيه تمثيل مكونات الجين داخل الخلية.

٨ - الأحداث المحددة لكمية الفيروس النهائية المنتجة داخل الخلية.

٩ - الميكانيكية التى تحدد وتضبط انتقال الفيروس من خلية لأخرى فى النسيج المصاب.

وعمومًا فإن الطرق العلمية والنظم الموجودة حاليًا تسمح بالإجابة لعدد كبير من التساؤلات السابقة بينما يمكن الوصول إلى إجابات عن البعض الآخر خلال السنوات القليلة القادمة وهذه تشمل:

١ - **الكائنات الانتقالية : Transgenic Organises**

حيث التعبير عن الجين الفيروسى المفرد فى النباتات الانتقالية يفتح الباب لإمكانيات عديدة لدراسة نقاط متعددة فى تضاعف الفيروس in vivo بالإضافة إلى تطور النظام الناقل مما يؤدى إلى تطوير التعبير عن الجين الفيروس منفرداً أو بمصاحبة العديد من الأنظمة فى الترتيبات.

٢ - تطفر أو إعادة بناء الفيروسات in vivo حيث إن القدرة على إحداث تغيرات أساسية أو بحقن فى أماكن معينة فى الجينوم الفيروس وتركيب الفيروس الهجين in vitro in vitro.

سوف يفتح إمكانيات عديدة لإجراء تجارب لتوضيح وظائف الجينوم الفيروس والبروتينات المشفرة من أجلها.

٣ - التوصيف فى الموقع in sitn transerip حيث إنه تحت الظروف المناسبة فإن الـ RNA الرسول يمكن أن يعمل كقالب لإعادة النسخ فى in situ خلال قطاعات من الأنسجة المتينة وهذا يسمح بالتعرف على بداية عملية النسخ وخلال هذه الخطوة فإن النيوكليتدات المشعة تستعمل للتعرف على مسار أو تمركز الـ RNA الرسول.

٤ - اختيار اللمرة المتسلسل PCR يعتبر طريقة جديدة فعالة التى تفتح المجال لإمكانية دراسة جزيئات الحمض النووى التى قد تتواجد فى نسخة واحدة أو عدة نسخ قليلة فى كل خلية.

٥ - تداخل الأحماض النووية حيث وجدت هذه الظاهرة فى النباتات المصابة بالأحماض النووية الصغيرة للفيروسات النباتية وهذه فى العادة تتكون نتيجة لطفرات فى الجينوم الفيروس الذى يتكون من ٥ أو ٣ تتابعات طرفية فى الجينوم مع حدوث تغيرات داخلية كبيرة.

وهذه من الممكن أن تصبح أدوات نافعه جداً لدراسة مختلف نواحى تضاعف، وميكانيكية بناء الجسيم كما أنها من الممكن أن تعطى فرصاً أكبر للتعديل فى طرق مقاومة الأمراض الفيروسية.

٢ - ٣ - أحداث المرض: Induction of the disease

إن دور الجين الفيروس وكذا دور جين العائل فى أحداث المرض يعتبر واحد من أهم المجالات التى يشملها البحث فى الفيروسات النباتية. أن الطرق السابق الإشارة من الممكن أن توصل إلى كثير من النقاط فى هذا الموضوع ولا عطاء مثال على ذلك فان طبيعة المساحات الخضراء القائمة فى النسيج الذى يحتوى على قليل أو عدم وجود الفيروس مثل الذى يحدث فى أمراض الموزيك لم يمكن التعرف عليها بدقة بعد حيث إن هذه المساحات الخضراء القائمة من النسيج تعتبر مقاومة للإصابة وكان مفترضاً من فترة طويلة أن بعض العمليات مثل Lysogeny من الممكن أن تعطى المقاومة لمثل هذه الأنسجة ولكن حتى الآن لم نتوصل إلى طريقة يمكن بها إثبات تلك الفكرة. إلا أنه من الممكن باستخدام PCR من البحث عن نيوكليتدات RNA الفيروس ف صورة الـ DNA فى النسيج الأخضر الغامق وهذه الطريقة من الممكن أن تكون حساسة بدرجة كافية للكشف عن نسخة واحدة من الجينوم الفيروس أو جزء منه فى الخلية الواحدة إن وجد.

٢ - المجال العوائلى : Host range

إن حقيقة أن فيروس معين يمكن أن يصيب بعض الأنواع النباتية والأصناف دون غيرها حتى ولو كانت قريبة جداً لبعضها أخذ اهتمام الباحثين فى مجال الفيروسات النباتية لعدد من السنين وتم التوصل إلى بعض الإصابات لكن مازال إجراء التجارب ممكنًا لتوضيح ذلك فعلى سبيل المثال لو أن خليطًا من سلالات فيروس X البطاطس أخذت من الدنات وحقنت فى عائل أجر من العائله الباذنجانية هو *Cyphomandra betaceae* نجد أن نوع معين من السلالات هو الذى يصيب هذا العائل جهازيًا إلا أنه ميكانيكًا اختبار هذه السلالة للعائل مازالت غير معروفة وممكن قد يكون التنافس بين ترك البروتين الفيروسى المشفر مع العائل ويمكن اختبار هذه الفترة عن طريق تحديد التتابع النيوكليتدى للسلالات المختلفة ولو حدث الاختلاف فى الجين المسئول عن التحرك فأنه يمن التغيير عن طريق تبديل الجين بين السلالات.

٢ - ٥ - البيئة : Ecology

بالرغم من أن دراسات قليلة قد أجريت على الفيروسات فى بيئتها الطبيعية إلا أنه ليس هناك ما يمنع من إجراء مزيد من البحوث فى هذا المجال. متى هذه الدراسات سوف توسع.

الباب الثانى عشر

مصطلحات

Glossary

مصطلحات

Glossary

الكائن : Organism

كائن حى غالبا ما يتكون من واحد أو أكثر من الخلايا القادرة على التكاثر بواسطة النمو وانقسام الخلية.

البلازميد : Plasmid

وحدة ذات وزن جزيئى صغير يتكاثر ذاتيًا، ومكونة من DNA دائرى مغلق بروابط تساهمية وخالٍ من البروتين وليس ضروريا لاستمرار الحياة لعوائله. البلازميدات تتواجد فقط فى البكتريا.

البريون : Prion

مسبب مرضى يحتوى على بروتين ومقاوم للتغيرات المؤثرة على الأحماض النووية. كما أن وجود أو عدم وجود حمض النواة فى البريونات ما زال يحتاج الى إجابة، والأكثر احتمالا أن البريونات تتكاثر داخل الخلايا ولكن ميكانيكية تكاثرها غير معروفة.

الفيروس : Virus

مسبب مرضى معدٍ صغير، يتكون من جزئٍي حمض نووى، عادة محاط بغلاف من البروتين. بعض الأغلفة الفيروسية تحتوى أيضًا على ليبيدات وكربوهيدرات. حمض النواة لجزئى الفيروس، ربما يكون RNA او DNA، وليس الاثنين معًا.

وللأحماض النووية الفيروسية القدرة على التكاثر مباشرة داخل الخلايا الملائمة، وتخليق جزئ أو أكثر من بروتينات متخصصة من ميتابوليزم العائل باستخدام ميكانيكية التخليق الحيوى للخلية فى عملية إنتاج الفيروسات الأولية **Progeny** تحاط الإنزيمات أو تحت الوحدات الإنزيمية بالفيروس، وفى بعض الحالات أيضًا بواسطة العائل المستخدم.

الفيروس المشوه: Defective Virus

جزء فيروس يفتقر إلى بعض المعلومات الوراثية اللازمة لتضاعفه، أو التى تقوم بوظيفة تخليق الغلاق البروتينى.

الفيروس المساعد: Helper Virus

فيروس له أهمية فى عملية تضاعف الفيروس الناقص (المشوه) أو الـ RNA التابع.

الفيروس التابع: Satellite RNA

RNA صغير يتجمع كرزمة (حزمة) مع القشور المصنوعة البروتينات المغلفة لفيروس آخر غير مرتبط من الفيروسات المساعدة، والتى يعتمد عليها Satellite RNA التابع لإتمام عملية تكاثره.

الفيروس البطىء: Slow Virus

اصطلاح غير دقيق استخدم للعوائل المعدية والمسببة لأمراض الحيوان, والتى تصبح واضحة فقط بعد مرور فترة حضانة طويلة (شهور إلى سنوات). بعض من تلك الأمراض قد تحدث بواسطة الفيروسات والأخرى بواسطة البريونات.

الفيرويد: Viroid

مسبب مرضى معدٍ يتكون من جزئ RNA ذات وزن جزيئى منخفض داخل الخلايا الحية الملائمة. تكتسب الفيرويدات تكاثرها مباشرة من ميتابوليزم العائل، مستخدمة ميكانيكية التخليق الحيوى للخلية وإنزيمات العائل بالتحديد.

الإصابة: Infection

وجود وتضاعف الكائنات الدقيقة سواء كانت فيروسات أو فيرويدات أو بريونات داخل العائل؛ مما يؤدى إلى حدوث مرض للعائل وظهور أعراض مرضية عليه.

الفيروس المتخفى: Latent Virus

فيروس يصيب العائل دون حدوث مظاهر المرض.

الإيبيسوم : Episome

حمض نووى يتكاثر كوحدة ذاتية داخل العائل، أو كوحدة غير كاملة ملتصقة بكروموسوم العائل.

كابسومير : Capsomer

وحدات مورفولوجية يتكون منها الكابسيد، وحيث إن هذه الوحدات المورفورلوجية لا يمكن تمييزها فى كابسيد الفيروسات ذات السميترية الحلزونية؛ لذا فإن استعمال هذا الاصطلاح لابد أن يكون مرتبطًا بالفيروسات ذات السيمترية المكعبة. تتكون الكابسيدات من وحدات، ويعتمد ظهورها فى الميكروسكوب الالكترونى على الحجم النسبى والمسافة بين وحدات البناء.

نيوكلوكابسيد : حمض النواة وغلافه من البروتين

حمض النواة يحمل المعلومات الوراثية للفيروس على حمض نووى ودونه لا يتضاعف الفيروس، وقد يكون هذا الحمض إما DNA أو RNA، ولا يتواجد معا فى الفيروس إلا إنه قد ظهر حديثًا أن الأورام الحيوانية المحتوية على RNA تحتوى على كميات قليلة من DNA؛ مما يشير إلى أن هذا التعريف غير دقيق، وقد يتغير.

الجينوم:

المعلومة الوراثية الكاملةمحمولة بداخل الفيروس كحمض نواة.

أجسام أولية : Elementary Bodies

جزئ فيروسى يرى بالميكروسكوب الضوئى.

الفيريون ـ جزئ الفيروس : Virion /Virus Particle

هذان الاصطلاحان متشابهان، وتعود على الفيروس الكامل، كما يرى فى الميكروسكوب الإلكترونى، كما أنه كامل لأن يكون قادراً على الإصابة. كلمة فيريون ربما تكون أصح للفيروس الكامل، أما كلمة جزئ الفيروس فكانت تطلق عندما كانت الطرق

أقل دقة، ولم تظهر التركيب للفيروس كاملاً. ربما يميز الفيروس على أنه طفيل إجبارى داخل الحلقة، يحتوى على نوع واحد من حمض النواة، ومحاط على الأقل بطبقة واحدة من البروتين، كما أنه غير قادر على الحركة الذاتية، وليس به قطاع إنزيمى ليخلق نفسه، دون الحاجة لمساعدة الخلايا الحية.

الظرف : Envelope

غشاء ليبوبروتين مأخوذ من غشاء خلية العائل فى أثناء انطلاق الفيروس، ويحيط بالنيوكلوكابسيد لبعض الفيروسات مثل فيروسات الإنفلونزا والحصبة، وربما يحمل الغلاف بروتينات خاصة بالفيروس، مع الوظيفة البيولوجية المميزة للفيروس، مثل هيماجلوتينين والنيورا ببتيديز. وهذه الوظائف ربما تكون مهمة أثناء إصابة الخلية، وبالتبعية انطلاق فيروسات جديدة.

هكسون :

وحدات مورفولوجية تظهر على سطح الفيروس، التى تكون محاطة بست وحدات أخرى مميزة، ويظهر فى موديل فيروس اوينو، على أنها هكسون ذات ست وحدات بنائية متجاورة.

بنتون :

وحدات مورفولوجية تظهر على سطح الفيروس محاطة بخمس وحدات متقاربة، بالحجم نفسه. وحيث إنه من الصعب تواجد خمس وحدات ملتصقة حول سادسة مشابهة على سطح أملس، فإن البنتون يقع دائمًا على القمة (apix).

الوحدات المورفولوجية :

تحت وحدات يمكن تمييزها فى الميكروسكوب الإلكترونى، وهى عبارة عن تجمع لوحدات بنائية.

الوحدة الكريستالية : Crystallographic

وهى وحدة تركيبية للفيروس، والتى تكون نظامًا مكرراً، ويمكن إظهارها بأشعة X،

وبالتالى فهى ملتصقة بالتالى بسمترية الفيروس.

وحدات بناء: **Sub Units**

هى عبارة عن أحجار البناء التى يبنى بها الفيروس، وهى عادة بروتينات متشابهة ذات وزن جزيئى ٢٠٠,٠٠٠، ويتم البناء باستعمال عدد كبير من تحت الوحدات حفظ حمض النواة والسيمترية فى الجزئ الفيروسى الناتج. الوحدات البنائية تظهر فى الميكروسكوب الإلكترونى كوحدات مورفولوجية، أو كمكونة لكابسيد الفيروسات ذات السيميترية الحلزونية.

الغطاء البروتينى: **Coatprotein**

اصطلاح يستعمل باتساع لطبقات البروتين للفيروس من خارج الكابسيد.

داى مورفيزم: **Dimorphism**

فيروس ذو شكلين مختلفين، وربما يظهر الفيروس الداى فورم فى شكلين فى تحضير واحد، وهذه ربما تكون متداخلة Inter Convirtible بتغيير الصبغات أو الـpH أو Hydration للتحضير.

مونومورفيزم: **Monomorphism**

ذات شكل مورفولوجى ثابت تكون فيه كل الجزئيات الفيروسية المتكاملة فى التحضير متشابهة، ورغم أن مظهرها قد يختلف قليلا معتمداً على اتجاهها أو وضعها على الشبكة.

بليومورفوزم: **Pleomorphism**

ذات أشكال وأحجام عديدة فى التحضير الواحد، وعلى ذلك فى الفيروس البليومورفيزم ليس له شكل مورفولوجى ثابت.

السيمترية: **Symmetry**

هذه خاصية تميز الكابسيد أكثر من الفيروس، وتستخدم من أجل تقسيم الفيروس، وتنشأ عن التكرار البنائى للكابسيد، والذى يتكون من عدة من الوحدات البنائية

المتشابهة.

تجمع الكابسيد من هذه الوحدات المتكررة له عديد من المميزات:

١ - كمية قليلة من حمض النواة تكفى لعمل تركيب بروتينى كبير، كما أن الجزء نفسه من حمض النواة يعاد استعماله لعدة مرات لعمل تحت وحدة متشابهة.

٢ - كل تحت وحدة محاطة بواسطة وحدات متشابهة، ولها الظروف نفسها.

٣ - تجمع جزء بجزء bit - by - bit للفيروس، ينتج عن رفض الوحدات المشوهة، والفيروسات تكون إما ذات سيمترية حلزونية أو مكعبة، وفى حالة غياب معلومات مميزة مثل فيروس الجدرى pox v يقال عادة إنه ذو سيمترية معقدة، وبهذا يكون مميزاً بشكل سيمترى.

السيمترية الحلزونية:

حيث وحدات الكابسيد حول الحمض النووى كأساس مكونة غلافًا حلزونى الشكل، وفى وسط محوره يوجد حمض النواة الحلزونى. وبالمفهوم نفسه فإن خيطًا بريميّاً له محور سيمترى بطول وسطه فى الفيروسات ذات السيمترية الحلزونية. هناك محور واحد للسيمترية.

السيمترية المكعبة:

المكعب له محاور سيمترية، كل ثلاث طيات three fold مراكز حوافها (ثنيتين)ومراكز أسطحها أربعة طيات (four). الفيروسات ذات المحاور المتشابهة يقال عنها إنها ذات سيمترية مكعبة، والحقيقة فإن كل الفيروسات ذات السيمترية المكعبة تكون من شكل ايكوزا هيدرون، الذى له ٢,٣,٥ محاور طيات للسيمترية.

ويمكن تقسيم الفيروسات إلى مجاميع على أساس سيمتيريتها، وكذلك على أساس شكل حمض النواة الذى تحتويه.

Skrew تطلق على فيروسات ذات السيمترية المكعبة، وهو يبين أن الكابسوميرات السطحية لمثل هذه الفيروسات ذات شكل يمينى أو شمالى، ومثل هذه الفيروسات تظهر

بريمية، وذلك راجع لغياب الحواف المميزة التى تظهـر فى حالـة الإيكوزا هيـدرون. كـما يظهـر من الفـحص الدقـيق للكابسـوميـرات أنه ليس بالإمكان تتـبع خط مـسـتـقـيم من الهكسونات من بنتون لاخر؛ ولذا فمن الضرورى التحرك خطوة لليسار **left handed** أو إلى حركة مشابهة.

إيكوزا هيدرون:

جسم جامد له عشرين سطح مشابه لمثلث متساوى الأضلاع. وهو شكل جيوميترى، والذى يعتمد عليه كالأساس الذى تبنى منه معظم أو ربما كل الفيروسات ذات السيمترية المكعبة، وبذلك يمكن أن يكون الفيروسات، وعلى أساس نظام الإيكوزا هيدرون فى نظام سيمترى ٥ :٣ :٢، وربما لا تحتوى على شكل إيكوزا هيدرون.

Plant Viruses
Contents

Preamble:

For Further Studies

1 - Alan Brunt, et al, Viruses of Plants, CAB, 1996.

2 - Alan Brunt, et al,: Viruses of Tropicul Plants, CAB, 1990.

3 - Allam, E.K. : Virology "Principles" Anglo Press, Cairo, 1993 (in Arabic).

4 - Dharma D. Shukla et al: The Potyviridae, CAB, 1994.

5 - David, R.H. : Molecular Virology, Bios Scientiufic Publishers, 1994.

6 - Hadidi, A, et al: Plant Viruses, Disease Control, APS, 1998.

7 - Harrison, B. et al: The Plant Viruses, Plenum Press, U.K., 1996.

8 - Matthews, R.E.F. Plant Virology, Third edition, ACP, 1991.

9 - Matthews, R.E.F.: Fundamentals of Plant Virology A.P., 1992.

10 - Mayer, C. et al: Antiviral Proteins in Higher Plants, CRC Press, 1994.

Plant Viruses

Prof. Dr. E.K. ALLAM

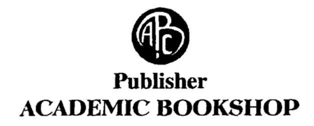
Faculty of Agriculture
Ain Shams University

Prof. Dr. E.A. SALAMA

Faculty of Agriculture
Cairo University

Prof. Dr. R.A. OMAR

Faculty of Agriculture
Kafr El Sheikh
Tanta University

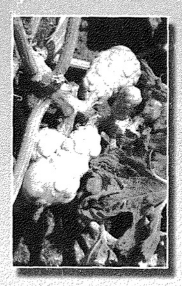


Publisher
ACADEMIC BOOKSHOP

2000

رقم الإيداع ٥٦١٤/٢٠٠٠

مطابع الدار الهندسية
تليفون/فاكس : ٥٤٠٢٥٩٨







هذا الكتاب

Plant Viruses

يحتاج العالم – طبقاً لتقدير الهيئات الدولية – إلى مضاعفة إنتاجه من المحاصيل الزراعية مع بداية القرن الحادى والعشرين وذلك لمواجهة مشكلة نقص الغذاء ... ومن هنا تأتى أهمية هذا الكتاب الذى يتناول بالدراسة الإنتاج الزراعى والنباتات المختلفة ، وما يؤثر عليها من أمراض وآفات وخاصة الفيروسات النباتية والتى قد تحد من الإنتاج الزراعى فى حالة وبائية بعض الفيروسات .

ويأتى هذا الكتاب ليسد نقصاً فى المكتبة العلمية العربية ، ويتكون من أثنى عشر فصلاً يتناول كل منها جانباً مهماً من الموضوع ، وقد زود الكتاب بعدد كبير من الأشكال والجداول والرسوم وذيل بقائمة لبعض المصطلحات الهامة ، بالإضافة إلى قائمة ببعض المراجع العربية والأجنبية للاستزادة .

وأخيراً ... أرجو أن يثرى هذا المرجع الهام المكتبة العربية وأن يعم بالفائدة على الدارسين والمهتمين بعلم فيروسات النبات .

والله ولى التوفيق ..؛

الناشر

ISBN : 977-281-135-9

ACADEMIC BOOKSHOP
C A I R O

